

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 228**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)
C12N 9/80 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2013** **PCT/EP2013/063258**
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014** **WO14001324**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2013** **E 13730906 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016** **EP 2867253**

54 Título: **Procedimiento para la selección y la producción de entidades de objetivación, como dianas, altamente selectivas y multiespecíficas, personalizadas, las cuales contienen por lo menos dos entidades de unión diferentes, y utilización de éstas**

30 Prioridad:

27.06.2012 EP 12173875

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

FENN, SEBASTIAN;
KOPETZKI, ERHARD y
TIEFENTHALER, GEORG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 597 228 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la selección y la producción de entidades de objetivación, como dianas, altamente selectivas y multiespecíficas, personalizadas, las cuales contienen por lo menos dos entidades de unión diferentes, y utilización de éstas.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se da a conocer un procedimiento para la selección y para la producción de entidades multiespecíficas, mediante la utilización de una transferasa, tal como la consistente en la Sortasa A, en donde, las especificidades, pueden elegirse de una forma independiente de cada una de las otras, y al uso de este procedimiento, para la generación de anticuerpos multiespecíficos personalizados.

Antecedentes y trasfondo de la invención

Los anticuerpos monoclonales, tienen un alto potencial terapéutico y, éstos, juegan un importante rol interpretativo, en el portafolio médico de hoy en día. Así, de este modo, durante el transcurso de la última década, una significativa tendencia, en la industria farmacéutica, ha venido siendo el desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAbs), y de los polipéptidos de fusión Fc (polipéptidos de fusión de fragmentos cristalizables), como agentes terapéuticos, en diversos escenarios clínicos, incluyendo a la oncología, a las enfermedades inflamatorias crónicas, a los trasplantes, a las enfermedades infecciosas, a la medicina cardiovascular, o la enfermedades oftalmológicas (véase, a dicho efecto, Carter, J.P., Nature Reviews Immunology 6 (2006) 343 - 357; Chan, A.C. y Carter, J.P., Nature Reviews Immunology 10 (2010) 301 - 316).

La eficacia clínica de un anticuerpo terapéutico, depende, principalmente, de dos funcionalidades: i) la unión específica a la diana, mediatizadas por el dominio Fv, y ii) la función efectora mediatizada inmune tal como la ADCC (citotoxicidad mediatizada por células, dependiente de un anticuerpo – ADCC, de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a antibody-dependent cell mediated cytotoxicity), la CDC (citotoxicidad dependiente de un complemento – CDC, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a complement-dependent cytotoxicity), y la ADCP (fagocitosis celular dependiente del anticuerpo – ADCP, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a antibody-dependent cellular phagocytosis), las cuales se mediatizan mediante la región anticuerpo Fc. La región Fc de una inmunoglobulina de la clase IgG, comprende la región bisagra y dos dominios constantes (CH2 y CH3). La región Fc, interactúa así mismo, también, con el receptor FcRn neonatal, y mediante ello, determina la vida media de un anticuerpo, in vivo. La región bisagra, es la región, a la cual, los brazos de la molécula anticuerpo, forman una estructura semejante a una Y, facilitando así, de este modo, un flexibilidad, en la molécula, en este punto. La(s) subclase / subclases IgG, difiere(n) en el número de enlaces de disulfuro y en la longitud de la región bisagra.

Las funciones efectoras asociadas con la región Fc de un anticuerpo, varían con la clase y la subclase de anticuerpos, y éstas incluyen, por ejemplo, a la unión de un anticuerpo, vía su región Fc, a un receptor específico Fc (FcR), sobre una célula, la cual desencadena varias respuestas biológicas (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Jiang, X.-R., et al., Nature Reviews Drug Discovery 10 (2011) 101 - 110; Presta, L.G., Current Opinion in Immunology 20 (2008) 460 - 470).

La región bisagra de un anticuerpo de una región Fc, que comprende un polipéptido o conjugado de fusión, se encuentra involucrada en por lo menos una parte de las funciones del anticuerpo, tal como la unión a un antígeno, y las funciones efectoras de anticuerpos mediatizadas por la región Fc. Mientras que, la unión a un antígeno (de una forma especial, la región anticuerpo ávida bivalente), depende la flexibilidad, de la longitud y de la orientación espacial de un región bisagra particular / natural, las funciones efectoras mediatizadas por la región Fc, dependen de la clase y subclases del anticuerpo. La monovalencia funcional observadas para algunos anticuerpos IgG4 humanos, en comparación con la bivalencia para los otros anticuerpos IgG humanos, es otro ejemplo, el cual muestra la involucración de la región Fc, en las propiedades de unión del antígeno (véase, a dicho efecto, Salfeld, J.G., Nature Biotechnology 12 (2007) 1369 - 1372; Presta, L.G., Current Opinion in Immunology 20 (2008) 460 - 470).

Levary, D.A., et al., reportan sobre la fusión proteína – proteína, catalizada por la Sortasa A (PLOS ONE 6 (2011)). El diseño, mediante ingeniería genética, de un anticuerpo del factor de crecimiento anti-epidérmico, en un formato de cadena individual, y el marcaje mediante la una ligadura de proteínas mediatizada por la sortasa A, se reporta por parte de Madej, M.P., et al. (Biotechnol. Bioeng. 109 (2012) 1461 - 1470). Ta, H.T., et al., reportan sobre un marcaje enzimático de anticuerpos de cadena individual, como una propuesta de procedimiento universal para técnicas de imagen molecular objetivizada como diana, y migración celular en enfermedades cardiovasculares (véase, a dicho efecto, Cir. Res. 109 (2011) 365 - 373). Popp, M., et al., reportan sobre la producción y rotura de enlaces, de proteínas, mediante ingeniería genética, mediante la utilización la sortasa (véase, a dicho efecto, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 50 (2011) 5024 - 5032). En la patente internacional WO 2010 / 087 994, se reportan procedimientos para la ligadura y la utilización de ésta.

Marvin, J.S., et al. reportan sobre propuestas de procedimientos recombinantes, a anticuerpos biespecíficos del tipo IgG (véase, a dicho efecto, Acta Pharmacol. Sin. 26 (2005) 649 - 658). Se reportan anticuerpos biespecíficos para la terapia contra el cáncer, por parte de Chames, P., et al. (Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 12 (2009) 276 - 283).

Resumen de la invención

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un procedimiento, para proporcionar moléculas terapéuticas, altamente específicas, personalizadas, para el tratamiento de una enfermedad, tal como la consistente en el cáncer, en un paciente, el cual se encuentre en necesidad de un tratamiento, a cuyo efecto, la molécula terapéutica, se adapta a las características de la enfermedad de los pacientes y / o al genotipo / fenotipo del paciente en cuestión.

Tal tipo de adaptación, se logra mediante la fabricación de una molécula personalizada (es decir, diseñada a medida), teniendo en cuenta el genotipo / fenotipo de la células del paciente, albergadas / afectadas por la enfermedad.

En una primera etapa, se procede a determinar el genotipo / fenotipo de las células (tal como, por ejemplo, la presencia y el número / calidad de antígenos de superficie celular específicos de la enfermedad), las cuales se pretende objetivizar como diana, con la molécula terapéutica. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante técnicas de imagen celular, tal como las consistentes en la tinción inmunohistoquímica (IHC, inmunohistoquímica) de la células del paciente, derivadas, por ejemplo, de la sangre o de un material procedente de una biopsia, mediante la utilización de anticuerpos monoespecíficos (terapéuticos o de diagnóstico), marcados mediante fluorescencia. De una forma alternativa, el genotipo / fenotipo de las células, puede analizarse, después de la tinción, mediante anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico, marcados, mediante la utilización de procedimientos basados en FACS (clasificación de células marcadas mediante fluorescencia). Las técnicas de utilización de imágenes, in vivo, incluyendo las técnicas de imagen óptica, de imágenes moleculares, de imágenes fluorescentes, de imágenes bioluminiscentes, MRI, PET, SPECT, CT y microscopia intravital, pueden también utilizarse, así mismo, también, para la determinación de las células relacionadas con la enfermedad, en un paciente. En dependencia de la genotipo / fenotipo determinado de las células relacionadas con la enfermedad, de un paciente, puede elegirse una combinación personalizada para un paciente (es decir, diseñada a medida), de entidades de objetivación / unión, y éstas, se combinan en una molécula terapéutica. Tal tipo de molécula terapéutica, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Tales tipos de moléculas terapéuticas personalizadas, i) serán altamente específicas, ii) tendrán una buena eficacia, y iii), inducirán menos efectos secundarios, en comparación con las terapéuticas convencionalmente elegidas. Esto puede llevarse a cabo, dotando, a la molécula terapéutica, de unas propiedades personalizadas mejoradas de objetivización y / o de suministro, tal como, por ejemplo, para una carga útil terapéutica, para su sitio previsto de acción.

El suministro mejorado de una molécula terapéutica a su sitio de acción, tal como, por ejemplo, una célula cancerosa, puede llevarse a cabo mediante una selectividad y / o especificidad más alta / incrementada de la molécula terapéutica objetivizada como diana, en comparación con las moléculas terapéuticas elegidas de una forma convencional. La molécula terapéutica, comprende por lo menos dos entidades, la cuales, se unen, de una forma específica, a diferentes antígenos (tales como, por ejemplo, los consistentes en dos diferentes marcadores de superficie), o dos diferentes epítopos, sobre el mismo antígeno (tal como, por ejemplo, dos diferentes epítopos sobre el mismo marcador de superficie).

La selectividad y / o especificidad incrementada de la molécula terapéutica personalizada (es decir, hecha a medida), puede lograrse mediante la unión simultánea de dos entidades de objetivización de dianas, a sus respectivas dianas / epítopos, es decir que, ésta se consigue mediante efectos de avidéz. Es especialmente apropiada, la combinación de dos entidades de unión, las cuales tengan una afinidad baja a media, as sus respectivas dianas / epítopos. De una forma adicional, una unión la cual no corresponda a la diana objetivizada, se reduce enormemente, o ésta, puede incluso eliminarse completamente.

Se ha encontrado el hecho de que, la objetivización biespecífica y la unión de moléculas diana, puede conseguirse mediante la utilización de una reacción de conjugación enzimática, entre una primera entidad de unión, tal como una entidad de unión basada en un dominio de DARPIn, una entidad de unión basada en un dominio anticarlina, una entidad de unión basada en un dominio VH de camello, una entidad de unión basada en el décimo dominio de fibronectina 3, una entidad de unión basada en un dominio de tenascina, una entidad de unión basada en un dominio de cadherina, una entidad de unión a base de un dominio de ICAM, una entidad de unión basada en un dominio de titina, una entidad de unión basada en un dominio de GCSF-R, una entidad de unión basada en un dominio de citocina, una entidad de unión basada en un dominio de un inhibidor de la glicosidasa, una entidad de unión basada en un dominio de superóxido dismutasa, o un fragmento de anticuerpo (fragmento Fab ó scFv), el cual comprende la secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser un residuo de aminoácidos), en su región de la secuencia de aminoácidos C-terminal, y un fragmento de anticuerpo provisto de un brazo, de una rama (OA-Fc), el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, apareada con una cadena ligera de longitud total, cognada, y polipéptido de la región Fc de cadena pesada, de un anticuerpo, con una oligo-glicina G_m (m = 2, ó 3, ó 4, ó 5), en su extremo terminal N, mediante la utilización de una enzima Sortasa A.

Se ha encontrado el hecho de que, mediante el procedimiento el cual se reporta aquí, en esta solicitud de patente, es posible el producir anticuerpos personalizados, tal como, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, dirigidos, de una forma específica, a dos marcadores de superficie, los cuales se encuentran en la superficie de una célula, tal como la consistente en una célula cancerosa. Puesto que, las especificidades de unión, se encuentran provistas, de una forma individual, mediante componentes de inicio, es por lo tanto posible el producir una molécula de objetivización de una diana, y de unión, personalizada, simplemente mediante la determinación de marcadores de superficie, presentes en una célula, tal como, por ejemplo, en una célula cancerosa, y conjugando los respectivos fragmentos de anticuerpo, los cuales se unan, de una forma específica, a estos marcadores de superficie, o sus respectivos ligandos, mediante un procedimiento enzimático. Puesto que, la conjugación enzimática, se efectúa mediante la enzima Sortasa A, el anticuerpo biespecífico resultante, se caracteriza por el hecho la presencia de la secuencia de aminoácidos LPX1TG ((SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos).

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se da a conocer un procedimiento para producir una molécula de unión multiespecífica, la cual comprende la etapa de incubar,

(i) una primera entidad de unión, la cual comprende, en los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos),

(ii) un fragmento de anticuerpo, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo,

en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno

en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y

en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos de la oligoglicina G_m ($m = 2$, ó 3 , ó 4 , ó 5), en su extremo N-terminal,

y

(iii) una enzima Sortasa A,

y, así, de este modo, producir la molécula de unión multiespecífica.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se da a conocer una molécula de unión multiespecífica, la cual comprende las siguientes etapas

(i) determinar los marcadores de superficie, celulares, presentes en una muestra que contiene una célula, e, i) seleccionar, de entre éstos, por lo menos un primer marcador de superficie, celular, y un segundo marcador de superficie, celular, ó ii) seleccionar, de entre éstos, una multitud de marcadores de superficie, celulares, correspondientes al número de especificidades de unión de una molécula de unión multiespecífica.

(ii) incubar (a) una primera entidad de unión, la cual se une, de una forma específica, al primer marcador de superficie, celular, o a su ligando, y el cual comprende, en los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos), (b) un fragmento de anticuerpo, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno, el cual se une, de una forma específica, al segundo marcador específico de superficie, o su ligando, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos de la oligoglicina G_m ($m = 2$, ó 3 , ó 4 , ó 5), en su extremo N-terminal, y (c) una enzima Sortasa A,

y, así, de este modo, producir la molécula de unión multiespecífica.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se da a conocer un procedimiento para la selección de dos entidades de unión, a partir de una colección / biblioteca de entidades de unión, las cuales se agrupan en molécula

de unión multiespecífica, individual, mediante, la incubación de (a) una primera entidad de unión, la cual se une, de una forma específica, a un primer epítipo o antígeno, y el cual comprende, en los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, (b) de un fragmento de anticuerpo, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno, el cual se une, de una forma específica, al segundo epítipo o antígeno, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos de la oligoglicina G_m ($m = 2, \text{ ó } 3, \text{ ó } 4, \text{ ó } 5$), en su extremo N-terminal, y (c) una enzima Sortasa A, para su uso como un agente terapéutico. Un agente ligante de este tipo, tiene unas propiedades mejoradas de objetivización de dianas / de suministro.

Un aspecto de la presente invención, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo biespecífico, el cual comprende la etapa de incubar

(i) un fragmento de anticuerpo Fab, o un anticuerpo scFv, el cual comprende, en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02), en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con $n = 1, 2 \text{ ó } 3$,

(ii) un fragmento de anticuerpo de una sola ramificación, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo,

en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, las cuales son complementarias, la una con respecto a la otra, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno

en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y

en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos GGCPX4C (SEQ ID NO: 08), en donde, X4, es S ó P, en su extremo N-terminal,

y

(iii) una enzima Sortasa A,

y, así, de este modo, producir el anticuerpo biespecífico.

Un aspecto de la presente invención, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo biespecífico, el cual comprende las siguientes etapas

(i) determinar los marcadores de superficie, celulares, presentes en una muestra que contiene células, y seleccionar, de entre éstos, por lo menos un marcador de superficie celular,

(ii) incubar (a) un fragmento de anticuerpo Fab, ó un anticuerpo scFv, el cual comprende, en los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con $n = 1, 2 \text{ ó } 3$, en donde, el fragmento Fab o el anticuerpo scFv, se une, de una forma específica, al primer marcador de superficie celular o su ligando, (b) un fragmento de anticuerpo, de una sola ramificación, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, complementarias, la una con la otra, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno, el cual se une, de una forma específica, al segundo marcador específico de superficie celular, o su ligando, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos GGCPX4C (SEQ ID NO: 08), en donde, X4, es S ó P, en su extremo N-terminal, y (c) una enzima Sortasa A,

y, así, de este modo, producir un anticuerpo biespecífico.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se da a conocer un procedimiento para determinar una combinación de entidades de unión, para una molécula de unión multiespecífica, la cual comprende las siguientes etapas:

5 (i) determinar la especificidad y / o selectividad y / o afinidad y / o función efectora, de unión, y / o vida media in vivo, de una multitud de moléculas de unión multiespecíficas, en donde, en la multitud de moléculas de unión multiespecíficas, se encuentra comprendida cada (posible) combinación de entidades de unión.

10 y

(ii) elegir la molécula de unión multiespecífica, con una apropiada especificidad y / o selectividad y / o afinidad y / o función efectora, de unión, y / o vida media, in vivo, y determinando, con ello, una combinación de sitios de unión al antígeno.

15 Un aspecto de la presente invención, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a un procedimiento para determinar una combinación de sitios de unión al antígeno, el cual comprende las siguientes etapas

20 (i) determinar la especificidad y / o selectividad y / o afinidad y / o función efectora, de unión, y / o vida media in vivo, de una multitud de anticuerpos biespecíficos, preparados mediante la combinación de (a) cada uno de los miembros de una primera multitud de fragmentos de anticuerpo Fab, o fragmentos de anticuerpo scFv, en donde, cada miembro, comprende, en los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con n = 1, 2 ó 3, en donde, el fragmento Fab o el anticuerpo scFv, se une, de una forma específica, al primer epítipo o antígeno, con (b)

25 cada miembro de una multitud de fragmentos de anticuerpo, de una sola ramificación, comprendiendo una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, complementarias, la una con la otra, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno, el cual se une, de una forma específica, al segundo epítipo o antígeno, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos GGCPX4C (SEQ

30 ID NO: 08), en donde, X4, es S ó P, en su extremo N-terminal, y (c) una enzima Sortasa A,

35

y

40 (ii) elegir el anticuerpo biespecífico, con una apropiada especificidad y / o selectividad y / o afinidad y / o función efectora, de unión, y / o vida media, in vivo, y determinando, con ello, una combinación de sitios de unión al antígeno.

Las entidades de unión, pueden seleccionarse, de una forma independiente las unas con respecto a la otras, de entre una entidad de unión basada en un dominio de DARPIn, una entidad de unión basada en un dominio de anticalina, una entidad de unión basada en un dominio de scTCR, semejante a un fragmento de un receptor de células T, una entidad de unión, basada en VH de camello, una entidad de unión basada en el décimo dominio de fibronectina 3, una entidad de unión basada en un dominio de tenascina, una entidad de unión basada en un dominio de cadherina, una entidad de unión a base de un dominio de ICAM, una entidad de unión basada en un dominio de titina, una entidad de unión basada en un dominio de GCSF-R, una entidad de unión basada en un dominio de citocina, una entidad de unión basada en un dominio de un inhibidor de la glicosidasa, una entidad de unión basada en un dominio de superóxido dismutasa, o fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab ó scFv.

45

50

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la molécula de unión multiespecífica, y / o la primera entidad de unión, es un fragmento de anticuerpo Fab, ó un anticuerpo scFv.

55

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la combinación, se caracteriza por la incubación del fragmento de anticuerpo Fab o fragmento de anticuerpo scFv, y el fragmento de anticuerpo, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, con una enzima Sortasa A.

60

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, de un fragmento de anticuerpo de una sola ramificación, son cadenas de anticuerpo, cognadas, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno, el cual se une, de una forma específica, al segundo marcador de superficie, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se

65

encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos de la oligo-glicina G_m (m = 2, ó 3, ó 4, ó 5), en su extremo terminal N.

- 5 El fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende, en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02), en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con n = 1, 2 ó 3).

- 10 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende, en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GSLPX1TGGSGS (SEQ ID NO: 03, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos).

- 15 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende, en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GGSLPX1TGGSGS (SEQ ID NO: 04, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos).

- 20 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos X2GSLPX1TGGSGS (SEQ ID NO: 05, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos), en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, en donde, X2, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, excepto G.

- 25 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TGGSGSX3 (SEQ ID NO: 06, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con n = 1, 2 ó 3), en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, en donde, X3, es una secuencia de aminoácidos tag.

- 30 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos X2GSLPX1TGGSGSX3 (SEQ ID NO: 07, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos), en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, excepto G, y en donde, X3, es una secuencia de aminoácidos tag.

- 35 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el polipéptido de la región Fc de cadena pesada de anticuerpo, comprende dos residuos de glicina en su extremo terminal N.

El fragmento de anticuerpo de una sola ramificación, comprende la secuencia de aminoácidos GGCPX4C (SEQ ID NO: 08), en el extremo N-terminal de su cadena pesada, en donde, X4, es S ó P.

- 40 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, X1 es E.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre una molécula de unión, multiespecífica, obtenida mediante un procedimiento el cual se da a conocer aquí.

- 45 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre una molécula de unión, multiespecífica, la cual comprende la secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos), en una de sus cadenas pesadas.

- 50 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la molécula de unión, multiespecífica, comprende la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, en donde, n = 1, 2 ó 3), en una de sus cadenas pesadas.

- 55 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la molécula de unión, multiespecífica, comprende la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TGGCPX4C (SEQ ID NO: 09, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, en donde, X4, puede ser S ó P, con n = 1, 2, ó 3), en una de sus cadenas pesadas.

- 60 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la molécula de unión, multiespecífica, comprende la secuencia de aminoácidos X2GSLPX1TGGCPX4C (SEQ ID NO: 10, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, en donde, X4, puede ser S ó P), en una de sus cadenas pesadas, en donde, X2, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, excepto G.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un anticuerpo biespecífico, obtenido mediante un procedimiento el cual se da a conocer aquí.

- 65 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un anticuerpo biespecífico, el cual comprende la

secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos), en una de sus cadenas pesadas.

5 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el anticuerpo biespecífico, comprende la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, en donde, n = 1, 2 ó 3), en una de sus cadenas pesadas.

10 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el anticuerpo biespecífico, comprende la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TGGCPX4C (SEQ ID NO: 09, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, en donde, X4, puede ser S ó P, con n = 1, 2, ó 3), en una de sus cadenas pesadas.

15 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el anticuerpo biespecífico, comprende la secuencia de aminoácidos X2GSLPX1TGGCPX4C (SEQ ID NO: 10, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, en donde, X4, puede ser S ó P), en una de sus cadenas pesadas, en donde, X2, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, excepto G.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre una formulación farmacéutica, la cual comprende una molécula de unión, multiespecífica, de la forma la cual se da a conocer aquí.

20 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre el uso de una molécula de unión, multiespecífica, de la forma la cual se da a conocer aquí, en la fabricación de un medicamento.

25 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el medicamento, es para el tratamiento del cáncer.

30 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un procedimiento para tratar a un individuo, el cual está afectado de cáncer, procedimiento éste, el cual comprende la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad efectiva de una molécula de unión, multiespecífica, de la forma la cual se da a conocer aquí, en este documento de solicitud de patente.

35 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un procedimiento para la destrucción de células cancerosas, en un individuo, procedimiento éste, el cual comprende la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad efectiva de una molécula de unión, multiespecífica, de la forma la cual se da a conocer aquí, en este documento de solicitud de patente.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre una formulación farmacéutica, la cual comprende un anticuerpo biespecífico, de la forma la cual se da a conocer aquí.

40 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre el uso de un anticuerpo biespecífico, de la forma la cual se da a conocer aquí, en la fabricación de un medicamento.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el medicamento, es para el tratamiento del cáncer.

45 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un procedimiento para tratar a un individuo, el cual está afectado de cáncer, procedimiento éste, el cual comprende la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad efectiva de un anticuerpo biespecífico, de la forma la cual se da a conocer aquí, en este documento de solicitud de patente.

50 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un procedimiento para destruir las células cancerosas, procedimiento éste, el cual comprende la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad efectiva de un anticuerpo biespecífico, de la forma la cual se da a conocer aquí, en este documento de solicitud de patente. En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, la región Fc, es una región Fc, humana, o una variante de ésta.

60 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo humano, es de la subclase IgG1, humana, o de la subclase IgG2, humana, o de la subclase IgG3, humana, o de la subclase IgG4, humana.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo, es una región Fc de la subclase IgG1, humana, o de la subclase IgG4, humana.

65 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo humano, comprende una mutación de un residuo de aminoácidos, de origen natural, de por lo menos uno de las siguientes

posiciones de aminoácidos, 228, 233, 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 329, y / ó 331, a un residuo diferente, en donde, los residuos, en la región Fc de anticuerpo, se enumeran, en concordancia con el índice de Kabat, de la Unión Europea (EU index de Kabat).

5 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo humano, comprende una mutación del residuo de aminoácidos, de origen natural, en la posición 329, y por lo menos una mutación adicional, de por lo menos un residuo de aminoácidos, seleccionado de entre el grupo el cual comprende los residuos de aminoácidos, en la posición 228, 233, 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, y 331, a un residuo diferente, en donde, los residuos, en la región Fc de anticuerpo, se enumeran, en concordancia con el índice de Kabat, de la Unión Europea (EU index de Kabat). El cambio de estos residuos de aminoácidos específicos, tiene como resultado una modificación de la función efectora de la región Fc, en comparación con la región Fc, no modificada (del tipo salvaje).

15 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo humano, tiene una afinidad reducida a los FcγRIIIA, y / ó FcγRIIA, y / ó FcγRI, en comparación con un conjugado el cual comprenda la correspondiente región IgG Fc, del tipo salvaje.

20 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el residuo de aminoácidos, en la posición 329, en la región Fc de anticuerpo humano, se encuentra sustituido por glicina, o arginina, o un residuo de aminoácidos el cual sea lo suficientemente grande, como para destruir el sándwich de prolina, en el ámbito de la región Fc.

25 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el residuo de aminoácidos, en la posición 329, en la región Fc de anticuerpo humano, del residuo de aminoácidos de origen natural, es, por lo menos, uno de entre los S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, P329G, y / o P331S.

30 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la mutación, es L234A y L235A, si la región Fc de anticuerpo, es de la subclase IgG humana, ó S228P y L235E, si la región Fc de anticuerpo, es de la subclase IgG4, humana.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo, comprende la mutación P329G.

35 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo, comprende la mutación T366W, en el primer polipéptido de la región Fc de cadena pesada, y las mutaciones T366S, L368A e Y407V, en el segundo polipéptido de la región Fc de cadena pesada, en donde, la enumeración, es en concordancia con el índice de Kabat, de la Unión Europea (EU index, de Kabat).

40 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo, comprende la mutación S354, en el primer polipéptido de la región Fc de cadena pesada, y la mutación Y349C en el segundo polipéptido de la región Fc de cadena pesada.

Descripción detallada y formas de presentación de la invención

45 I. DEFINICIONES

50 En la presente especificación, y en las reivindicaciones anexas, la enumeración de los residuos, en una región Fc de cadena pesada, de la inmunoglobulina, es la correspondiente a índice de Kabat de la Unión europea (véase, a dicho efecto, Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., - Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 5 edición, - Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, - Servicio de salud pública, Institutos nacionales de la salud -, MD (1991), Publicación del NIH 91 - 3242, publicación ésta, la cual se incorpora aquí, en este documento de solicitud de patente, a título de referencia).

55 El término "modificación", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una mutación, adición, o supresión de uno o de más residuos de aminoácidos, en una secuencia de aminoácidos progenitora, tal como, por ejemplo, un polipéptido de anticuerpo o polipéptido de fusión, el cual comprenda, por lo menos una porción de unión FcRn, de una región Fc, para obtener un polipéptido de anticuerpo, o polipéptido de fusión, variante.

60 El término "mutación de aminoácidos", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa la modificación, en la secuencia de aminoácidos, de una secuencia de aminoácidos progenitora. Las modificaciones ejemplares, incluyen a las sustituciones, inserciones, y / o supresiones. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la mutación de aminoácidos, es una sustitución. El término "mutación de aminoácidos, en la posición", significa la sustitución o la supresión del residuo especificado, o de inserción, de por lo menos un residuo de aminoácidos, adyacente o contiguo al residuo especificado. El término

“inserción contigua a un residuo especificado”, significa la inserción en el ámbito de uno o dos residuos de éste. La inserción en cuestión, puede ser N-terminal ó C-terminal, al residuo especificado.

El término “sustitución de aminoácidos”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa el reemplazo de por lo menos un residuo de aminoácidos, en una secuencia de aminoácidos predeterminada, con un residuo de aminoácidos de “reemplazo”, diferente. El residuo o residuos de reemplazo, puede ser un “residuo de aminoácidos de origen natural” (a saber, codificado mediante el código genético), y seleccionado de entre el grupo consistente en: alanina (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val). En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el residuo de reemplazo, no es la cisteína. La sustitución mediante uno o más residuos de aminoácidos de origen natural, se encuentra también abarcada, así mismo, aquí, mediante la definición de una sustitución de aminoácidos. Un residuo de aminoácidos que no son de origen natural”, significa un residuo, distinto a los residuos de aminoácidos de origen natural, los cuales se han listado anteriormente, arriba, residuo éste, el cual sea capaz de unirse, de una forma covalente, al residuo o a los residuos de aminoácidos contiguos, en una cadena de polipéptido. Los ejemplos de residuos de aminoácidos los cuales no son de origen natural, incluyen a la norleucina, a la norvalina, a la homoserina, al aminoácido aib, y otros residuos de aminoácidos, análogos, los cuales se describen por parte de Ellman, et al., Meth. Enzym. 202 (1991) 301 - 336. Para generar tales tipos de residuos de aminoácidos, los cuales no son de origen natural, pueden utilizarse los procedimientos de Noren, et al. (Science 244 (1989) 182) y / o de Ellman, et al. (el cual se ha mencionado anteriormente, arriba). De una forma resumida, estos procedimientos, involucran el hecho de activar químicamente un tRNA supresor, mediante un residuo de aminoácidos que no sean de origen natural, seguido por una transcripción y traducción, in vitro, del RNA. Los aminoácidos los cuales no son de origen natural, pueden también incorporarse, así mismo, en péptidos, vía síntesis química de péptidos, y la subsiguiente fusión de estos péptidos, con polipéptidos producidos de una forma recombinante, tales como los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos.

El término “inserción de aminoácidos”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa la incorporación de por lo menos un residuo de aminoácidos adicional, en el ámbito de una secuencia de aminoácidos progenitora predeterminada. Mientras que, la inserción en cuestión, consistirá, de una forma usual, en la inserción de uno o más residuos de aminoácidos, la presente solicitud de patente, contempla mayores “inserciones de péptidos”, tal como, por ejemplo, la inserción de aproximadamente dos hasta aproximadamente cinco residuos de aminoácidos, o incluso hasta aproximadamente diez residuos de aminoácidos. El residuo o residuos insertados, pueden ser de origen natural, o bien, éstos pueden ser de origen no natural, de la forma la cual se ha definido anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente.

El término “supresión de aminoácidos”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa la eliminación de por lo menos un residuo de aminoácidos, en una posición predeterminada de la secuencia de aminoácidos.

En el ámbito de esta solicitud de patente, cuando se menciona una modificación de aminoácidos, se trata de una modificación deliberada de aminoácidos, y de una modificación aleatoria o al azar de aminoácidos.

El término “secuencia de aminoácidos tag), tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una secuencia de residuos de aminoácidos, conectados los unos con los otros, vía enlaces de péptidos, la cual tiene propiedades específicas de unión. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la secuencia de aminoácidos tag, es una afinidad o purificación tag. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la secuencia de aminoácidos, tag, se selecciona de entre Arg-tag, His-tag, Flag-tag, 3xFlagtag, Strep-tag, Nano-tag, SBP-tag, c-myc-tag, S-tag, péptido de unión a la calmodulina, dominio de unión a la celulosa, dominio de unión a la citina, GST-tag, ó MBP-tag. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la secuencia de aminoácidos, tag, se selecciona de entre la SEQ ID NO: 11 (RRRRR), ó la SEQ ID NO: 12 (RRRRR), ó la SEQ ID NO: 13 (HHHHH), ó la SEQ ID NO: 14 (KDHLIHNHVHKEFHAAHANK), ó la SEQ ID NO: 15 (DYKDDDDK), ó la SEQ ID NO: 16 (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK), ó la SEQ ID NO: 17 (AWRHPQFGG), ó la SEQ ID NO: 18 (WSHPQFEK), ó la SEQ ID NO: 19 (MDVEAWLGAR), ó la SEQ ID NO: 20 (MDVEAWLGARVPLVET), ó la SEQ ID NO: 21 (MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRLARLEHHPQGQREP), ó la SEQ ID NO: 22 (EQKLISEEDL), ó la SEQ ID NO: 23 (KETAAKFERQHMD), ó la SEQ ID NO: 24 (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL), ó la SEQ ID NO: 25 (dominio de unión a la celulosa), ó la SEQ ID NO: 26 (dominio de unión a la celulosa), ó la SEQ ID NO: 27 (TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ), ó la SEQ ID NO: 28 (GST-tag), ó la SEQ ID NO: 29 (MBP-tag).

El término “fragmento de anticuerpo”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una molécula, distinta de un anticuerpo de longitud total, la cual comprende una porción de anticuerpo, de longitud total, la cual se une al antígeno, la cual se enlaza el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena individual (tal como, por ejemplo, el scFv), y

anticuerpos multiespecíficos, formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de anticuerpos, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, y scFv, y otros fragmentos, los cuales se describen posteriormente, más abajo, a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpos, véase el trabajo de Hudson, P.J., et al., en Nat. Med. 9 (2003) 129 - 134. Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, - La farmacología de los anticuerpos monoclonales -, volumen 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), páginas 269 - 315; véase así mismo, también, la patente internacional WO 93 / 16 185; la patente estadounidense US 5. 571. 894 y la patente estadounidense US 5. 587. 458. Para una discusión de los fragmentos Fab y F(ab')₂, los cuales comprenden los residuos de epítomos de unión al receptor salvaje, y que tienen una vida media in vivo incrementada, véase la patente estadounidense US 5. 869. 046.

Los diacuerpos, son fragmentos de anticuerpos, con dos sitios de unión al antígeno, los cuales pueden ser bivalentes o específicos. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, la patente europea EP 0 404 097; la patente internacional WO 1993 / 01 161; Hudson, P.J., et al., Nat. Med. 9 (2003) 129 - 134; y Holliger, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444 - 6448. Los triacuerpos y tetracuerpos, se describen así mismo, también, en Hudson, P.J., et al., Nat. Med. 9 (2003) 129 - 134).

Los anticuerpos de dominio individual, son fragmentos de anticuerpos, los cuales comprenden la totalidad o una porción de un dominio variable de cadena pesada, o la totalidad o una porción de un dominio variable de cadena ligera. En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, un anticuerpo de dominio individual, es un anticuerpo de dominio individual, humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, a dicho efecto, por ejemplo, la patente estadounidense U.S. No. 6. 248. 516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos, pueden producirse mediante varias técnicas, incluyendo, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstas, a la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como también la producción mediante células huésped recombinantes (tal como, por ejemplo, E. coli ó fago), de la forma la cual se describe aquí, en este documento de solicitud de patente.

El término "anticuerpo biespecífico", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una molécula de unión a un antígeno, la cual puede unirse, de una forma específica, a un primer antígeno o epítopo, y a un segundo antígeno o epítopo, en donde, el primer antígeno o epítopo, es distinto del segundo antígeno o epítopo.

Los formatos de anticuerpos biespecíficos, se describen, por ejemplo, en las patentes internacionales WO 2009 / 08 0251, WO 2009 / 080 252, WO 2009 / 080 253, WO 2009 / 080 254, WO 2010 / 112 193, WO 2010 / 115 589, WO 2010 / 136 172, WO 2010 / 145 792, y WO 2010 / 145 793.

El término "citotoxicidad mediatizada por células dependiente de anticuerpos", abreviado, "ADCC" (de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a "antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity"), tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una reacción mediatizada por células, en la cual, las células citotóxicas no dependientes del antígeno, las cuales expresan los FcRs (tales como, por ejemplo, las células asesinas naturales, (células NK – de sus iniciales en idioma inglés correspondientes a natural killer cells). Los neutrófilos, y los macrófagos), reconocen a una célula objetivizada como diana, mediante una unión a la región Fc de la inmunoglobulina, y subsiguientemente, provocan la lisis de la célula objetivizada como diana. Las células primarias para mediatizar la ADCC, las células NK, expresan únicamente el FcγRIII, mientras que, los monocitos, expresan los FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La expresión del FcR, en células hematopoyéticas, se resume en la Tabla 3, en la página 464, de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457 - 492.

El término "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos", abreviado, "ADCP", significa un proceso, mediante el cual, las células recubiertas con un anticuerpo, se mediatizan, bien ya sea en su totalidad, o bien ya sea en parte, mediante células inmunes fagocíticas (tales como, por ejemplo, los macrófagos, los neutrófilos, o las células dendríticas), las cuales se unen a una región Fc de la inmunoglobulina.

El término "unión a un receptor Fc", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa la unión de una región Fc, a un receptor Fc, en por ejemplo el ensayo del tipo "BIAcore® assay" (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia).

En el ensayo del tipo "BIAcore(R) assay", se procede a unir el receptor Fc, a una superficie, y la unión del analito, tal como por ejemplo, la consistente en una región Fc, la cual comprenda un polipéptido de fusión o un analito, y se procede a su medición, mediante resonancia de plasmón superficial (SRP – de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a "surface plasmon resonance") (SPR). La afinidad de la unión, se define mediante los términos K_a (constante de asociación: constante de proporción, para la asociación del polipéptido o conjugado de fusión de la región Fc, para formar un complejo región Fc / receptor Fc), K_d (constante de disociación, constante de proporción,

para la disociación del polipéptido o conjugado de fusión de la región Fc, procedente de un complejo región Fc / receptor Fc), y KD (kd / ka). De una forma alternativa, la señal de unión de un sensograma de SPR, puede compararse directamente a la señal de respuesta de una referencia, con respecto a la altura de la señal de resonancia y los comportamientos de disociación.

El término "C1q", significa un polipéptido, el cual incluye un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. El C1q, conjuntamente con dos serina proteasas, C1r y C1s, forma el complejo C1, el primer componente de la trayectoria de citotoxicidad dependiente de complementos (CDC – de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a complement dependent cytotoxicity -). El C1q, puede adquirirse, en el mercado, de procedencia de, por ejemplo, la firma Quidel, San Diego, California.

El término "dominio CH2", significa una parte del polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo, la cual se extiende desde la posición EU 231 hasta la posición EU 340 (sistema de enumeración EU, en concordancia con Kabat). En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el dominio CH2, tiene la secuencia de aminoácidos de

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWWDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQESTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAK (SEQ ID NO: 30).

El dominio CH2, es único, en el sentido de que, éste no se encuentra íntimamente apareado con otro dominio. En lugar de ello, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas, enlazadas a N, se encuentran interpuestas entre los dos dominios CH2, en una región Fc nativa, intacta. Se ha venido especulando con el hecho consistente en que, el hidrato de carbono, puede proporcionar un sustituto para el apareado dominio – dominio, y que éste ayuda a estabilizar el dominio CH3. Véase, a dicho efecto, Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161 - 206.

El término "dominio CH3", significa la parte de una cadena polipéptido de cadena pesada de un polipéptido, la cual se extiende aproximadamente desde la posición EU 341 hasta la posición EU 446. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el dominio CH3, tiene la secuencia de aminoácidos de

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO: 31).

El término "clase", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un tipo de dominio constante, o de región constante, la cual se encuentra poseída por su cadena pesada. Existen cinco clases mayores de anticuerpos, en los humanos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de entre éstas, se encuentran divididas, de una forma adicional, en subclases (isotipos), tales como, por ejemplo, los consistentes en los IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada, los cuales corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas, se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente.

El término "citotoxicidad dependiente de complementos", de una forma abreviada "CDC" (de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a "complement-dependent cytotoxicity"), tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un mecanismo para inducir la muerte celular, en la cual, una región Fc, es polipéptido o conjugado de fusión de la región Fc, activa una serie de reacciones enzimáticas, las cuales culminan con la formación de orificios o huecos, en la membrana celular objetivizada como diana. De una forma típica, los complejos antígeno – anticuerpo, tales como aquéllos consistentes en células diana unidas a anticuerpos, se unen a un componente complemento C1 q, y lo activan, el cual, a su vez, activa la cascada del complemento, conduciendo así, de este modo, a la muerte celular. La activación de un complemento, puede también dar como resultado, así mismo, la deposición de componentes de complemento en la superficie de la células objetivizadas como diana, que facilitan la ADCC ó la ADCP, mediante la unión a los receptores del complemento (tal como, por ejemplo, CRE), sobre los leucocitos.

El término "función efectora", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa aquéllas actividades biológicas, las cuales son atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, las cuales pueden variar, con la subclase de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos, incluyen a: la citotoxicidad de unión a C1q y dependiente del complemento (CDC); la unión al receptor Fc; la citotoxicidad mediatizada por células, dependiente del anticuerpo (ADCC); la fagocitosis (ADCP); la regulación a la baja de los receptores de células superficiales (tal como, por ejemplo, un receptor de las células B); y la activación de las células B. Tal tipo de función, puede efectuarse mediante, por ejemplo, la unión de una región Gc a un receptor Fc, o una célula inmune, con actividad fagocítica o lítica, o mediante la unión de una región Fc, a componentes del sistema del complemento.

El término "cantidad efectiva", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a una cantidad efectiva, a unas dosificaciones y durante unos periodos de tiempo, los cuales sean necesarios, para conseguir el deseado resultado terapéutico o profiláctico.

El término “función efectora reducida”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una reducción de una función efectora específica, la cual se encuentra asociada con una molécula, tal como por ejemplo, la ADCC ó la CDC, en comparación con una molécula de control, (tal como, por ejemplo, un polipéptido con una región Fc del tipo salvaje, en un porcentaje de por lo menos un 20%. El término “función efectora fuertemente reducida”, significa una reducción de una función efectora específica, asociada con una molécula, tal como, por ejemplo la ADCC ó la CDC, en comparación con una molécula de control, en un porcentaje de por lo menos un 50 %.

El término “región Fc”, significa una región C-terminal de una inmunoglobulina. La región Fc, es una molécula dimérica, la cual comprende dos fragmentos de cadena pesada de un anticuerpo ligado a disulfuro (cadenas de polipéptido de la región Fc de cadena pesada). Una región Fc, puede generarse mediante la digestión de papaína, o mediante la digestión de IdeS, ó mediante la digestión de tripsina, de un anticuerpo intacto (de longitud total), o bien, ésta puede producirse de una forma recombinante.

La región Fc, obtenible de un anticuerpo de longitud total, o la inmunoglobulina, de longitud total, comprende, por lo menos por lo menos dos residuos 226 (Cys), en el término C, de la cadena pesada de longitud total, y así, de este modo, ésta comprende una parte de la región bisagra y dos o tres dominios constantes, a saber, un dominio CH2, un dominio CH3, y un dominio adicional / extra CH4, en los anticuerpos de la clase IgE e IgM. Se conoce, a raíz de las patentes estadounidenses U S 5. 648. 260, y U S 5. 624. 821, el hecho consistente en que, la modificación de residuos de aminoácidos conocidos, en la región Fc, tiene como resultado unos efectos fenotípicos.

La formación de la región Fc dimérica, la cual comprende dos fragmentos de cadena pesada de un anticuerpo, idénticas o no idénticas, se encuentra mediatizada por la dimerización no covalente de los dominios CH3 comprendidos (para los residuos de aminoácidos los cuales se encuentran involucrados, véase, por ejemplo, Dall'Acqua, Biochem. 37 (1998) 9266 - 9273). La región Fc, se estabiliza, de una forma covalente, mediante la formación de enlaces de disulfuro, en la región bisagra (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo de Huber, et al., publicado en Nature 264 (1976) 415 - 420; y el trabajo de Thies, et al., publicado en J. Mol. Biol. 293 (1999) 67 - 79). La introducción de cambios en los residuos de aminoácidos, en el ámbito del dominio CH3, con objeto de interrumpir la dimerización de las interacciones del dominio CH3 – CH3, o afectan, de una forma adversa, a la unión al receptor Fc neonatal (FCRn), debido al hecho de la localización de los residuos involucrados en la dimerización del dominio CH3 – CH3, se encuentran localizados sobre la interfaz interior del dominio CH3 – CH3, mientras que, la interacción de los residuos involucrados en la interacción región Fc – FCRn, se encuentran localizados sobre el exterior del dominio CH2 – CH3.

Los residuos asociados con las funciones efectoras de una región Fc, se encuentran localizados en la región bisagra, el dominio CH2, y / o el dominio CH3, según se determina para una molécula de anticuerpo de longitud total. Las funciones asociadas / mediatizadas de la región Fc, son las siguientes:

- (i) la citotoxicidad celular dependiente de un anticuerpo (ADCC),
- (ii) la unión a un complemento (C1q), activación, y citotoxicidad dependiente de un complemento (CDC),
- (iii) la fagocitosis / despeje de los complejos antígenos – anticuerpo,
- (iv) la liberación citocinas, en algunos casos, y
- (v) vida media / tasa de despeje de complejos anticuerpos y de antígenos – anticuerpos.

La región Fc asociada con las funciones efectoras, se inician mediante la interacción de la región Fc, con moléculas o receptores específicos de la función efectora. En la mayoría de los casos, los anticuerpos de la subclase IgG1, pueden efectuar la activación de los receptores, mientras que, los anticuerpos de las clases IgG2 e IgG4, no tienen una función efectora, o éstos tienen una función efectora limitada.

Los receptores los cuales producen la función efectora, son los tipos (y los subtipos) de receptores Fc, consistentes en los del tipo FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Las funciones efectoras asociadas con una subclase de IgG1, pueden reducirse mediante la introducción de cambios de aminoácidos, específicos, en la región bisagra inferior, tales como los consistentes en los L234A y / ó L235A, los cuales se encuentran involucrados en la unión de los FcγR y C1q. Así mismo, también, determinados residuos de aminoácidos, los cuales se encuentren especialmente localizados en el dominio CH2 y / o CH3, se encuentran asociados con la vida media circulante de una molécula de anticuerpo, o un polipéptido de fusión de la región Fc, en la corriente sanguínea. La vida media circulatoria, se determina mediante la unión de la región Fc a un receptor Fc neonatal (FcRn).

Los residuos de sialilo los cuales se encuentran presentes en la glicoestructura de la región Fc, se encuentran involucrados en la actividad mediatizada antiinflamatoria de la región Fc (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo de Anthony, R.M., et al., en Science 320 (2008) 373 - 376).

La enumeración o numeración de los residuos de aminoácidos, en la región constante de un anticuerpo, se realiza en concordancia con el índice EU de Kabat (véase, a dicho efecto, Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of

Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, - Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 5ª Edición, Servicios de la Salud Pública, Instituto Nacional de la Salud, Bethesda. Nº de publicación del NHI, 91 342).

- 5 El término "región Fc humana", tal y como ésta se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina de origen humano, la cual contiene por lo menos una parte de la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de cadena pesada de un anticuerpo de IgG humana, se extiende desde aproximadamente Glu215, ó desde aproximadamente Cys226, ó desde aproximadamente Pro230, hasta el extremo terminal carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, no obstante, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc del anticuerpo, puede encontrarse presente, o bien ésta puede no encontrarse presente

- 15 El término "región Fc variante", significa una secuencia de aminoácidos, la cual difiere de una secuencia de aminoácidos de la región Fc, "nativa" o "del tipo salvaje, en virtud de por lo menos una "modificación / mutación de aminoácidos". En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc variante, tiene por lo menos una mutación de aminoácidos, en comparación de la región Fc nativa, o en comparación de una región Fc del polipéptido progenitor, tal como, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez mutaciones de aminoácidos y, en una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, desde aproximadamente una hasta aproximadamente cinco mutaciones de una región Fc nativa, o en la región Fc del polipéptido progenitor. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc (variante), tiene un porcentaje de homología de aproximadamente un 80%, con una región Fc del tipo salvaje y / o con una región Fc de un polipéptido progenitor, y en una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc variante, tiene un porcentaje de homología, de aproximadamente un 90%, y en una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc variante, tiene un porcentaje de homología de aproximadamente un 95%.

- 30 Las regiones Fc variantes, tal y como éstas se reportan aquí, en este documento de solicitud de patente, se definen mediante las modificaciones de aminoácidos las cuales éstas contienen. Así, por ejemplo, el término P329G, significa una región Fc variante, con la mutación de prolina a glicina, en la posición del aminoácido 329, con relación a la región progenitora (del tipo salvaje). La identidad del aminoácido del tipo salvaje, puede no estar especificada, en cuyo caso, la variante anteriormente mencionada, arriba, se refiere a 239G. Para todas las posiciones las cuales de discuten en la presente invención, la enumeración o numeración, se lleva a cabo en concordancia con el índice EU. El índice EU índice EU como en Kabat, o el esquema de enumeración EU, se refiere a la enumeración o numeración del anticuerpo EU (véase, a dicho efecto, el trabajo publicado por Edelman, et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78 - 85, el cual se incorpora aquí, en su totalidad, a título de referencia). La modificación, puede tratarse de una adición, de una supresión, o de una mutación. El término "mutación", significa un cambio en los aminoácidos de origen natural, así como, también, un cambio en aminoácidos que no son de origen natural, véase, a dicho efecto, por ejemplo, la patente estadounidense U S 6. 586. 207, la patente internacional WO 98 / 48 032, la patente internacional WO 03 / 073 238, la patente estadounidense U S 2004 / 0 214 988, la patente internacional WO 2005 / 35 727, la patente internacional WO 2005 / 74 524, Chin, J.W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 9026 - 9027; Chin, J.W. y Schultz, P.G., ChemBioChem 11 (2002) 1135 - 1137; Chin, J.W., et al., PIGAS United States of America 99 (2002) 11020 - 11024; y, Wang, L. y Schultz, P.G., Chem. (2002) 1 - 10 (trabajos éstos, los cuales se incluyen aquí, en su totalidad, en este documento de solicitud de patente, a título de referencia).

- 45 Una cadena de polipéptido de una región Fc humana, del tipo salvaje, de la subclase IgG1, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

50 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 32).

- Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con las mutaciones L234A, L235 A; tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

60 CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCS
65 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 33).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación T366S, 368A, e Y407V, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

5 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
10 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación T366W, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

15 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI
20 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 35).

25 Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación L234A, L235A y T366S, 368A, 368A, e Y407V, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
30 NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 36).

35 Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación L234A, L235A y T366W, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
40 NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37).

45 Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación P329G, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
50 KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38).

55 Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación L234A, L235A y P329G, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
60 NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39).

65 Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación P239G y T366S, 368A, e Y407V, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación P329G y T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación L234A, L235A, P329G y T366S, 368A, y Y407V, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG1, con una mutación L234A, L235A, P329G y T366W, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 43).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana, del tipo salvaje, de la subclase IgG4, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 44).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG4, con una mutación S228P y L235E, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 45).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante, de la subclase IgG4, con una mutación S228P y L235E, y P329G, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 46).

El término "receptor Fc", de una forma abreviada, "FcR", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un receptor, el cual se une a una región Fc. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el FcR, es una FcR humana, de secuencia nativa. De una forma adicional, en una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el FcR, es un FcR, el cual se une a un anticuerpo FcR (un receptor Fc gamma) y éste incluye a los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo a las variantes alélicas y, de una forma alternativa, a las formas empalmadas de éstas. Los receptores FcγRII, incluyen a los receptores FcγRIIA (un "receptor de activación"), y a los receptores FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), los cuales tienen, ambos, unas secuencias de aminoácidos similares, las cuales difieren, principalmente, en los dominios citoplásmicos de éstos. El receptor de activación, FcγRIIA, contiene un motivo de activación de inmunoreceptores, basado en tirosina (ITAM – [de sus iniciales en idioma inglés, "immunoreceptor tyrosine-based activation motif"] -), en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB, contiene un motivo de inhibición de inmunoreceptores, basado en tirosina (ITIM – [de sus iniciales en idioma inglés, "immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif"] -), en su dominio citoplásmico (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo de Daëron, publicado en M., Annu. Rev. Immunol. 15 (1997) 203 - 234). Los FcRs, se han revisado, por parte de Ravetch y Kinet, en un trabajo publicado en Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457 - 492, también, por parte de Capel, et al., en un trabajo publicado en Immunomethods 4 (1994) 25 - 34, y por parte, también, de, de Haas, et al., en un trabajo publicado en J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330 - 341. Otros FcRs, incluyendo a aquéllos los cuales se identificarán en el futuro, se incorporan aquí, en este documento de solicitud de patente, mediante el término, "FcR". El término en cuestión, incluye así mismo, también, al receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable para la transferencia de IgGs maternos, al feto (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo publicado por parte de Guyer, et al., en J. Immunol. 117 (1976) 587; y el trabajo publicado por Kim, et al., en J. Immunol. 24 (1994) 249).

El término "receptor Fc gamma", y en su forma abreviada "FcγR", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa cualquier familia de proteínas, las cuales se unen a la región Fc del anticuerpo IgG, y que se encuentran codificadas por un gen FcγR. En los humanos, esta familia, incluye, si bien no de una forma limitativa en cuanto a ésta, al FcγRII (CD64), incluyendo a las isoformas FcγRIA, FcγRIB, y FcγRIC, FcγRII (CD32), incluyendo a las isoformas FcγRIIA, (incluyendo a los alotipos H131 y R131), FcγRIIB (incluyendo a los FcγRII-B-1 y FcγRIIB-2) y FcγRIIC, y FcγRIII (CD16), incluyendo a las isoformas FcγRIIIA (incluyendo a los alotipos V158 y F158), y FcγRIII (incluyendo a los alotipos FcγRIIB-NA1 y FcγRII-NA2), (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo de Jefferis, et al., publicado en Immunol. Lett. 82 (2002) 57 - 65, el cual se incorpora aquí, en este documento de solicitud de patente, a título de referencia), así como también, cualesquiera FcγRs humanos, o isoformas o alotipos de FcγRs, los cuales no se hayan descubierto todavía. Una forma de FcγR, puede ser la procedente de un organismo, incluyendo éste, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los humanos, a los ratones, a las ratas, a los conejos, y a los monos. Los FcγRs de los ratones, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), y FcγRIII-C (CD16-2), así como también, cualesquiera FcγRs o isoformas o alotipos de FcγRs, del ratón, los cuales no se hayan descubierto todavía. Los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción región Fc – FcγR, son los 234 – 239 (región bisagra inferior), 265 – 269 (bucle B / C), 297 – 299 (bucle D / E), y 327 – 332 (bucle F / G), (véase, a dicho efecto, el trabajo de Sondermann, et al., publicado en Nature 406 (2000) 267 - 273). Las mutaciones de aminoácidos las cuales tienen como resultado una unión / afinidad disminuidas para los FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y / o FcγRIII, incluyen a la N297 (de una forma concomitante una disminución inmunogénica y una prolongada unión / afinidad, en cuanto a lo referente a la vida media), (véase, a dicho efecto, el trabajo de Routledge, et al., publicado en Transplantation 60 (1995) 847; el trabajo de Friend, et al., publicado en Transplantation 68 (1999) 1632; el trabajo de Shields, et al., publicado en J. Biol. Chem. 276 (2001) 659 1- 6604), a los residuos 233 - 236 (véase, a dicho efecto, el trabajo de Ward y Ghetie, publicado en Ther. Immunol. 2 (1995) 77; y el trabajo de Armour, et al., publicado en Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613 - 2624). Algunas sustituciones ejemplares de aminoácidos, se encuentran descritas en la patente estadounidense U S 7. 355. 008, y en la patente estadounidense U S 7. 381. 408.

El término "receptor Fc neonatal", y de una forma abreviada, "FcRn", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una proteína, la cual se une a la región Fc del anticuerpo IgG, y éste se encuentra codificado, por lo menos en parte, mediante un gen FcRn. El FcRn, puede ser de procedencia de cualquier organismo, incluyendo, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los humanos, a los ratones, a las ratas, a los conejos y a los monos. Tal y como es conocido, en arte especializado de la técnica, la proteína FcRn funcional, comprende dos polipéptidos, a los cuales se les hace referencia, a menudo, como la cadena pesada y la cadena ligera. La cadena ligera, es la beta-2-microglobulina, y la cadena pesada, se encuentra codificada por el gen Fcn. A menos que se notifique de una forma distinta, en este documento de solicitud de patente, FcRn y una proteína FCRn, se refiere a un complejo de FcRn, de cadena pesada, con beta-2-microglobulina. Los residuos de

aminoácidos de la región Fc, los cuales actúan con el FcRn, se encuentran cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los residuos de contacto región Fc – FcRn, se encuentran, todos ellos, en el ámbito de una cadena pesada de IgG. Los residuos involucrados, son los 248, 250 - 257, 272, 285, 288, 290 - 291, 308 - 311, y 314 (todos ellos, en el dominio CH2 domain), y los residuos de aminoácidos 385 - 387, 428, y 433 - 436 (todos ellos, en el dominio CH3).

5 Las mutaciones de aminoácidos, las cuales tienen como resultado una unión / afinidad incrementadas, para el FcRn, incluyen a los T256A, T307A, E380A, y N434A (véase, a dicho efecto, el trabajo de Shields, et al., publicado en J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591 - 6604).

El término “anticuerpo de longitud total”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un anticuerpo, el cual tiene una estructura y una secuencia de aminoácidos, las cuales son substancialmente idénticas a las correspondientes a una estructura de anticuerpo nativo, así como las correspondientes a los polipéptidos los cuales comprenden las regiones FcRn, tal y como éstas se reportan, aquí, en este documento de solicitud de patente.

El término “cadena pesada de un anticuerpo, de longitud total”, tal como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un polipéptido, el cual comprende, en la dirección N – terminal a C – terminal, un motivo variable de anticuerpo, un primer dominio constante, así como, también, una región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, un segundo dominio constante, y un tercer dominio constante.

El término “región Fc de cadena pesada de un anticuerpo”, tal como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un polipéptido, el cual comprende una región bisagra de cadena pesada de anticuerpo, un primer dominio constante, y un segundo dominio constante.

El término “cadena ligera de un anticuerpo, de longitud total”, tal como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un polipéptido, el cual comprende, en la dirección N – terminal a C – terminal, un dominio variable de un anticuerpo, y un dominio constante.

El término “región bisagra”, tal como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un polipéptido de cadena pesada, de un anticuerpo, el cual se une, en la cadena pesada de un anticuerpo, del tipo salvaje, el dominio CH1 y el dominio CH2, tal como, por ejemplo, desde aproximadamente la posición 216, hasta la aproximadamente la posición 230, en concordancia con el sistema de numeración o enumeración de EU, de Kabat, o desde aproximadamente la posición 226 hasta aproximadamente la posición 230, en concordancia con el sistema de numeración o enumeración Eu de Kabat. Las regiones bisagra, y otras subclases de IgG, pueden determinarse, mediante la alineación con las secuencia de los residuos de cisteína de la región bisagra, de la subclase IgG1.

La región bisagra, se trata, normalmente, de una molécula dimérica, la cual consiste en polipéptidos, con secuencias idénticas de aminoácidos. La región bisagra, comprende, de una forma general, aproximadamente 25 residuos de aminoácidos, y ésta es flexible, permitiendo, a las regiones de unión al antígeno, el que éstas se muevan de una forma independiente. La región bisagra, puede subdividirse en tres dominios: el dominio de bisagra superior, el dominio de bisagra intermedio, el dominio de bisagra inferior (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el trabajo realizado por Roux, et al., y publicado en J. Immunol. 161 (1998) 4083).

El término “región bisagra inferior”, tal como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa una región Fc, la cual extiende a los residuos de aminoácidos, inmediatamente C-terminales, a la región bisagra, a saber, los residuos 233 a 239 de la región Fc, en concordancia con la numeración (enumeración) EU de Kabat.

El término “región Fc del tipo salvaje”, significa una secuencia de aminoácidos, la cual es idéntica a la de una secuencia de la región Fc, la cual se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas, del tipo salvaje, incluyen a una región Fc de la IgG, humana (alotipos no A, y A), una región Fc de la IgG3 humana, y una región Fc de la IgG4, humana, así como también, a las variantes de éstas, de origen natural.

El término “individuo”, o “sujeto”, tal como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un mamífero. Los mamíferos, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los animales domesticados (tales como, por ejemplo, los consistentes en las vacas, las ovejas, los gatos, los perros, y a los caballos), a los primates (tales como, por ejemplo, los consistentes en los primates no humanos, tales como los monos), a los conejos, y a los roedores (tales como, por ejemplo, los consistentes en los ratones y en los gatos). En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, el individuo o sujeto, es un humano.

La frase “porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos”, con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos, en una secuencia candidata, la cual es idéntica, con respecto a los residuos de aminoácidos, en la secuencia del polipéptido de referencia, después haber procedido a alinear las secuencias y a introducir desfases o brechas, en caso necesario, con objeto de conseguir el porcentaje máximo de identidad de la secuencia, y no considerar cualesquiera sustituciones de conservación, como parte de la identidad de la secuencia. El alineamiento, para los propósitos de determinación del porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos, puede llevarse a cabo de distintas formas o vías, las cuales

son conocidas por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica, tal como, por ejemplo, mediante la utilización de los sistemas de "software" informáticos para ordenadores o computadoras, abiertos al público en general, tales como los consistentes en los sistemas de "software" informático, de los tipos BLAST, BLAST-2, ALIGN ó Megalign (DNASTAR). Las personas expertas en el arte especializado de la técnica, podrán determinar los parámetros los cuales sean apropiados para alinear secuencias, incluyendo a cualesquiera algoritmos los cuales sean necesarios para llevar a cabo un alineamiento máximo, sobre la longitud total de las secuencias las cuales se estén comparando. Sin embargo, no obstante, para los propósitos los cuales se pretenden como objetivo, aquí, en este documento de solicitud de patente, los valores de los porcentajes (%) de la identidad de las secuencias de aminoácidos, se generan, mediante la utilización de un programa de "software" informático para computadoras u ordenadores, de separación de secuencias, del tipo ALIGN - 2. El programa de "software" informático para computadoras u ordenadores, de separación de secuencias, del tipo ALIGN - 2, fue creado por la firma Genentech, Inc., y el código de la fuente, se cumplimentó, mediante la documentación para usuarios la cual se encuentra disponible en la entidad estadounidense de derechos de autor, U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en donde, ésta, se encuentra registrada bajo el número de registro (U.S. Copyright Registration No) TXU510087. El programa de "software" informático para computadoras u ordenadores, de separación de secuencias, del tipo ALIGN - 2, se encuentra comercialmente disponible, en el mercado, para el público en general, de procedencia de la firma Genentech, Inc., South San Francisco, California (Estados Unidos de América), o éste puede compilarse, a partir del código de la fuente.

El programa de "software" informático para computadoras u ordenadores, de separación de secuencias, del tipo ALIGN - 2, debe compilarse para su uso en un sistema operativo del tipo UNIX, incluyendo al sistema digital UNIX V4.0D. La totalidad de los parámetros de comparación de secuencias, se ajustan y configuran, mediante el programa de "software" informático para computadoras u ordenadores, de separación de secuencias, del tipo ALIGN - 2, y éstos, no varían.

En las situaciones en donde se procede a emplear el programa de "software" informático para computadoras u ordenadores, de separación de secuencias, del tipo ALIGN - 2, para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje (%) de identidad de las secuencias de aminoácidos, de una determinada secuencia de aminoácidos A, con respecto, o con, o contra una determinada secuencia de aminoácidos B (a la cual se le puede hacer referencia, de una forma alternativa, como determinada secuencia de aminoácidos A; la cual comprende un cierto porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos, con respecto, o con, o contra, una determinada secuencia de aminoácidos, B), se calcula del siguiente modo:

$$100 \text{ veces la fracción } X / Y$$

en donde, X, es número de los residuos de aminoácidos calificados como apareamientos idénticos, mediante el programa de "software" informático para computadoras u ordenadores, de separación de secuencias, del tipo ALIGN - 2, en el programa de alineamiento de A y B, y en donde, Y, es el número total de residuos de aminoácidos, en B. Se apreciará el hecho consistente en que, allí en donde, la longitud de la secuencia de aminoácidos, A, no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos, B, el porcentaje de identidad de las secuencia de aminoácidos A, con respecto a la B, no será igual al porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos B, con respecto a la A. A menos de que se especifique de otro modo, todos los valores de porcentaje (%) de identidad de las secuencias de aminoácidos, de la forma que éstos se utilizan aquí, en este documento de solicitud de patente, se han obtenido del modo el cual se describe, en el párrafo anteriormente precedente, mediante la utilización del programa de software informático, para computadoras y ordenadores, de separación de secuencias, del tipo ALIGN -2.

El término "formulación farmacéuticamente aceptable", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a una preparación, la cual se encuentra en una forma tal que permita el hecho de que, la actividad biológica de un ingrediente nativo, contenido en ésta, sea efectiva, y la cual no contenga componentes adicionales, los cuales sean tóxicos, de una forma inaceptable, para un sujeto al cual se le administre la formulación en cuestión.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" (o "soporte farmacéuticamente aceptable)", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a un ingrediente, en una formulación farmacéutica, el cual es distinto de un ingrediente activo, y el cual no es tóxico, para un sujeto. Un portador o soporte farmacéuticamente aceptable, incluye, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a un tampón, a un excipiente, a un estabilizante, o a un conservante.

El término "fenotipo de un paciente", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a una composición de receptores de superficie celular, en una clase de células procedentes de un paciente. La composición en cuestión, puede ser una composición cualitativa, así como también, una cuantitativa. Las células para las cuales se determina / se proporciona el genotipo, puede ser una célula individual, o bien, una muestra, la cual comprende células múltiples.

El término “posición”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a la localización de residuo de aminoácidos, en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. La posiciones, puede numerarse o enumerarse, de una forma secuencial, o en concordancia con un formato preestablecido, tal como, por ejemplo, un índice UE de Kabat, para una numeración (enumeración) de anticuerpos.

El término afinidad de unión a un FcR, “modificada”, ó actividad ADCC, “modificada”, significa un polipéptido, el cual tenga, bien ya sea una actividad de unión a un FcR, y / o actividad ADCC, enriquecida, o bien ya sea una actividad de unión a un FcR, y / o actividad ADCC, disminuida, a un polipéptido progenitor (tal como, por ejemplo, un polipéptido, el cual comprenda una región Fc del tipo salvaje). El polipéptido variante, el cual “tiene una unión incrementada”, a un FcR, se une por lo menos a un FcR, con una constante de disociación más baja (es decir, una mejor / más alta afinidad), que la correspondiente al polipéptido progenitor del tipo salvaje. La variante del polipéptido, la cual “tiene una unión disminuida”, a un FcR, se une a por lo menos un FcR, con una mayor constante de disociación (a saber, una afinidad peor / más baja), que la correspondiente a su polipéptido del tipo salvaje. Tales tipos de variantes, las cuales exhiben una unión disminuida a un FcR, pueden poseer una unión reducida, o no apreciable, a un FcR, al como, por ejemplo, un porcentaje de unión del 0 – 20 %, para el FcR, en comparación con el de una región Fc de la IgG, del tipo salvaje o progenitora.

El polipéptido el cual se une a un FcR, con una “afinidad reducida”, en comparación con un polipéptido progenitor o del tipo salvaje, es un polipéptido, el cual se une a cualquiera de entre uno o más, de los FcRs anteriormente identificados, arriba, con una afinidad de unión (substancialmente) reducida, en comparación con la correspondiente al polipéptido progenitor, cuando las cantidades de la variante del polipéptido, y del polipéptido progenitor, en el ensayo de unión, son (esencialmente) las mismas. Así, por ejemplo, la variante del polipéptido, con una reducida afinidad de unión al FcR, puede exhibir una reducción en la afinidad de unión al FcR, en comparación con la correspondiente al polipéptido progenitor, en un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde aproximadamente 1,15 veces hasta aproximadamente 100 veces, tal como, por ejemplo, una reducción correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 1,2 veces, hasta aproximadamente 50 veces, en donde se determina la afinidad para de unión al FcR.

El polipéptido el cual comprende una región Fc variante, la cual “mediatiza la citotoxicidad mediatizada por células dependiente de un anticuerpo (ADCC), en presencia de células efectoras humanas, de una forma menos efectiva, que la correspondiente a un polipéptido progenitor, se trata de uno, el cual, in vitro o in vivo, es (substancialmente) menos efectivo”, en la mediatización de la ADCC, cuando las cantidades del polipéptido variante y del polipéptido progenitor, utilizadas en el ensayo, son (esencialmente) aproximadamente las mismas. Generalmente, tales tipos de variables, se identificarán, mediante la utilización de un ensayo de ADCC, in vitro, tal y como se discute aquí, en este documento de solicitud de patente, pero se contemplan así mismo, también, otros ensayos y procedimientos para determinar la actividad de la ADCC, tal como, por ejemplo, en un modelo animal, etc. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la variante es menos efectiva, en la mediatización de la ADCC, que el progenitor, en un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde aproximadamente 1,5 veces hasta aproximadamente 100 veces, tal como, por ejemplo, en un valor correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde aproximadamente dos veces, hasta aproximadamente cincuenta, en por ejemplo, en el ensayo in vitro el cual se da a conocer aquí, en este documento de solicitud de patente.

El término “receptor”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un polipéptido, el cual es capaz de unirse a por lo menos un ligando. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el receptor, es un receptor de superficie celular, el cual tiene un dominio extracelular de unión a un ligando y, de una forma opcional, otros dominios (tales como, por ejemplo, un dominio transmembrana, u dominio intracelular y / o anclaje de membrana). El receptor a ser evaluado, en el ensayo el cual se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, puede ser el consistente en un receptor intacto, o un fragmento, o un derivado de éste (tal como, por ejemplo, una proteína de fusión, la cual comprende el dominio de unión del receptor, fusionado a uno o más polipéptidos homólogos). De una forma adicional, el receptor a ser evaluado para sus propiedades de unión, puede encontrarse presente en una célula o aislamiento y, de una forma opcional, éste puede aplicarse, a modo de recubrimiento, sobre una placa de ensayo, o sobre cualquier otra fase sólida.

El término “tratamiento” (y las variaciones gramaticales de éste, tal como las consistentes en “tratar” o “tratando”), tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a intervenciones clínicas, en una tentativa o esfuerzo para modificar el curso natural de un individuo el cual se esté tratando, y éste puede llevarse a cabo, bien ya sea para la profilaxis, o bien, durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a la prevención o evitar que acontezca una enfermedad, o que reaparezca ésta, al alivio o mitigación de los síntomas, a la disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, a la prevención o evitar la metástasis, a la disminución de la tasa progresión de la enfermedad, a la mejora o paliación del estado de la enfermedad, y a la remisión o prognosis mejorada. En algunas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, los anticuerpos los cuales se reportan aquí, en este documento de solicitud de patente, pueden utilizarse para retardar el desarrollo de una enfermedad, o bien, para enlentecer la progresión de una enfermedad.

II. Moléculas de unión, multiespecíficas y personalizadas

En la mayoría de las enfermedades basadas en células, la objetivación como diana de las células relacionadas con la enfermedad, vía una unión basada en un receptor, o moléculas receptoras, es una proposición de procedimiento prometedor. Sin embargo, no obstante, el nivel de expresión, de receptores superficiales clínicamente relevantes (= diana), varía, de un paciente a otro paciente y así, de ese modo, la eficacia de los fármacos basados en anticuerpos estandarizados, es muy diferente. Este razonamiento, se aplica, de una forma específica, para las moléculas de unión biespecíficas y multiespecíficas, cuyo modo de acción, es el consistente en objetivizar, como diana, dos diferentes epítomos / receptores, de una forma simultánea.

Una proposición de procedimiento prometedor, es la consistente en diseñar un fármaco (aquí, en este caso, una molécula de unión biespecífica o multiespecífica), de una forma especial, para la situación particular / individual de respectivo paciente.

Cada célula procedente de un individuo, es diferente, en vistas a las moléculas superficiales expresadas, tales como las consistentes en receptores, en número y clase. Esto es especialmente verdad, para las células cancerosas, y para las células no cancerosas. Así de este modo, una célula, puede caracterizarse por las moléculas de superficie celular.

En base a los datos del perfil de expresión de receptores de superficie clínicamente relevantes, en células de un paciente, asociadas con enfermedades, se elige, de una forma específica, una serie de entidades de unión (tales como, por ejemplo, las consistentes en fragmentos Fab), procedentes de una biblioteca, y éstas se combinan, en una molécula de unión multiespecífica, como el fármaco específico para un paciente. Estas moléculas de unión seleccionadas, se eligen, de una forma específica, con respecto a la respectiva célula asociada con la enfermedad, tal como, por ejemplo, la consistente en una célula tumoral, tal como, por ejemplo, en el nivel de expresión de los receptores de superficie y, así, de este modo, la necesidad y el fenotipo del paciente individual.

Esta clase de caracterización, puede efectuarse mediante técnicas de imágenes de células, in vitro, e in vivo. Las técnicas de imágenes de células, in vivo, incluyen, por ejemplo, a las técnicas de imágenes ópticas, a las técnicas de imágenes moleculares, a las técnicas de imágenes por fluorescencia, a las técnicas de imágenes por bioluminiscencia, a las técnicas de imágenes consistentes en las MRI (imagen por resonancia magnética), PET (tomografía por emisión de positrones), SPECT (tomografía computerizada de emisión monofotónica), CT (tomografía computerizada), y microscopia intravital. Las técnicas de imagen in vivo, incluyen, por ejemplo, al marcaje por tinción inmunohistoquímica, de células de pacientes, tales como, por ejemplo, el consistente en marcadores de superficie de células, específicos, de reconocimiento de anticuerpos marcados, y análisis de las señales fluorescentes, mediante microscopía. De una forma alternativa, el genotipo / fenotipo de las células, puede analizarse después del marcaje por tinción, con anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico, marcados, mediante la utilización de procedimientos basados en FACS (Clasificación de células, activada por fluorescencia – [de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a Fluorescence-activated cell sorting] -).

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el genotipo / fenotipo, de las células derivadas de un paciente, se determina mediante un procedimiento basado en las técnicas de FACS. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, los marcadores de superficie de células, se determinan mediante la utilización anticuerpos de diagnóstico, o terapéuticos, marcados mediante fluorescencia. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, se utilizan anticuerpos terapéuticos, marcados por fluorescencia.

Ciertas clases de enfermedades, pueden correlacionarse con un cambio, en el número de moléculas de superficie celular, específicas, o con la aparición o incidencia, de una nueva molécula de superficie celular.

Los individuos los cuales se encuentran afectados de una enfermedad de este tipo, exhibirán, en el ámbito de ciertos rangos, un modelo patrón de marcadores de superficie celular, específicas para una enfermedad y / o específicas para un individuo.

Este hecho, debe tomarse en consideración, con objeto de proporcionar, a un individuo de esta clase, un terapéutica objetivizada como diana, y personalizada (es decir, hecha a medida).

En el ámbito de la técnica especializada, se conoce un gran número de anticuerpos terapéuticos, los cuales están dirigidos contra las moléculas de superficie celular, y sus ligandos, y las cuales pueden ser utilizados para la selección y la construcción de entidades multiespecíficas de objetivización de dianas, personalizadas, tales como los consistentes en los Rituxan / MabThera / Rituximab, 2H7 / Ocrelizumab, Zevalin / Ibrizumomab, Arzerra / Ofatumumab (CD20), HLL2 / Epratuzumab, Inotuzomab (CD22), Zenapax / Daclizumab, Simulect / Basiliximab (CD25), Herceptin / Trastuzumab, Pertuzumab (Her2 / ERBB2), Mylotarg / Gemtuzumab (CD33), Raptiva / Efalizumab (Cd11a), Erbitux / Cetuximab (EGFR, - Receptor del crecimiento epidérmico- [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes "epidermal growth factor receptor"] -), IMC-1121B (receptor VEGF 2), Tysabri / Natalizumab

(subunidad $\alpha 4$ de las integrinas $\alpha \beta 1$ y $\alpha \beta 3$), ReoPro / Abciximab (integrinas gpIIb - gpIIa y $\alpha \beta 3$), Orthoclone OKT3 / Muromonab-CD3 (CD3), Benlysta / Belimumab (BAFF), Tolerx / Oteliximab (CD3), Soliris / Eculizumab (proteína del complemento C5), Actemra / Tocilizumab (IL-6R), Panorex / Edrecolomab (EpCAM, molécula de adhesión celular epitelial), CEACAM5 / Labetuzumab (CD66 / CEA, antígeno carcinoembrionario), CT-11 (PD-1, receptor inhibitorio de células T, de muerte programada, 1), CD-d279), H224G11 (receptor c-Met), SAR3419 (CD19), IMC - A12 / Cixutumumab (IGF-1R, receptor del factor de crecimiento, semejante a la insulina, del tipo 1), MEDI - 575 (PDGF - R, receptor del factor de crecimiento, derivado de plaquetas), CP - 675, 206 / Tremelimumab (antígeno de linfocitos T, citotóxicos, del tipo 4), RO5323441 (factor de crecimiento de placentario ó PGF - de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a "placenta growth factor"), HGS1012 / Mapatumumab (TRAIL - R1), SGN-70 (CD70), Vedotin(SGN-35) / Brentuximab (CD30), y ARH460-16-2 (CD44).

Para la determinación de los marcadores de superficie celular los cuales se encuentran presentes en una muestra, al como, por ejemplo, de un paciente, se conocen varios procedimientos. Un procedimiento ejemplar, es que se basa en la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), de una forma particular, el análisis de poblaciones de células marcadas por tinción y clasificadas. En este procedimiento, el fenotipado de la muestra (población celular), se lleva cabo procediendo a analizar las células individuales, con respecto a los marcadores de superficie celular presentados, mediante la utilización de anticuerpo marcados por fluorescencia, dirigidos contra estos marcadores, incluyendo, de una forma opcional, la distribución estadística de los marcadores de superficie, en la población celular). Es especialmente, para el uso de los anticuerpos terapéuticos, el hecho de que, éstos, se hayan marcado con un marcador fluorescente, para estos propósitos, y que así, de este modo, mediante ello, se asegure el hecho consistente en que, la última molécula de unión, multiespecífica y personalizada (es decir, hecha a medida), se una al mismo epítipo que el anticuerpo de diagnóstico. Las moléculas de unión multiespecíficas / anticuerpos específicos, de la forma la cual éstos se reportan aquí, en este documento de solicitud de patente, pueden utilizarse en la preparación de medicamentos para el tratamiento de, por ejemplo, una enfermedad oncológica, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, una enfermedad metabólica (tal como, por ejemplo, una enfermedad endocrina), o una enfermedad neurológica (tal como por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa). Los ejemplos ejemplares, no limitativos, de estas enfermedades, son los consistentes en la enfermedad de Alzheimer, los linfomas de no Hodgkin, las leucemias linfoides agudas y crónicas de células B, el linfoma de Burkitt, el linfoma de Hodgkin, la leucemia de células vellosas, las leucemias mieloides agudas y crónicas, los linfomas y leucemias de células T, el mieloma múltiple, el glioma, la macroglobulinemia de Waldenstrom, los carcinomas (tales como los consistentes en los carcinomas de la cavidad oral, los carcinomas del tracto intestinal, los carcinomas del colon, los carcinomas del estómago, los carcinomas del tracto pulmonar, los carcinomas pulmonares, los carcinomas del pulmón, los carcinomas del pecho (de mama), los carcinomas de ovarios, los carcinomas de próstata, los carcinomas del útero, los carcinomas del endometrio, los carcinomas del cuello uterino, los carcinomas de la vejiga urinaria, los carcinomas del páncreas, los carcinomas óseos, los carcinomas del hígado, los carcinomas de la vesícula biliar, los carcinomas de los riñones, los carcinomas de la piel, y los testículos), los melanomas, los sarcomas, los gliomas, y los cánceres de la piel, la púrpura trombocitopénica idiopática aguda, la púrpura trombocitopénica idiopática crónica, la dermatomiositis, la corea o corea de Sydenham, la miastenia gravis, el lupus eritematoso sistémico, la nefropatía lúpida, la fiebre reumática, los síndromes poliglandulares, el penpigoide ampolloso, la diabetes mellitus, la púrpura de Henoch - Schonlein purpura, la nefritis postestreptocócica, el eritema nudoso, la arteritis de Takayasu, la enfermedad de Addison, la artritis reumatoidea, la esclerosis múltiple, la sarcoisidosis, la colitis ulcerante, el eritema multiforme, la nefropatía IgA (enfermedad de Buerger), la poliarteritis nudosa, la espondilitis anquilosante, el síndrome de Goodpasture, la tromboangeítis obliterante (tromboangeítis obliterans), el síndrome de Sjogren, la cirrosis biliar primaria, la tiroiditis de Hashimoto, la tiroiditis, la tirotoxicosis, el escleroderma, la hepatitis activa crónica, la polimiositis / dermatomiositis, la policondritis, el pénfigo vulgar (pemphigus vulgaris), la granulomatosis de Wegener, la nefropatía membranosa, la esclerosis lateral amiotrófica, la tabes dorsal, la arteritis / polimialgia, la anemia perniciosa, la glomerulonefritis rápidamente progresiva, la psoriasis, o la alveolitis fibrosante.

Se conocen, en arte especializado de la técnica, un gran número de marcadores de superficie celular, y sus ligandos. Así, por ejemplo, se ha reportado el hecho de que, las células cancerosas, expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores de superficie celular y o ligandos, incluyendo, si bien no de una forma limitativa en cuanto a estos, a los consistentes en la anhidrasa carbónica IX, B7, la alfa-fetoproteína, la alfa-actinina-4, A3 (antígeno específico para el anticuerpo A33), ART-4, B7, Ba-733, BAGE, antígeno BrE3, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8/m, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CDS, CD8, CD1-1A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1-alfa, antígeno p específico del colon, (CSAp), CEA (CEACAM5), CEACAM6, c-met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1, EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, GAGE, GROB, HLA-DR, HM1.24, gonadotropina coriónica humana (HCG) y sus subunidades, HER2/neu, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2 ó 1a, IGF-1R, IFN-gamma, IFN-alfa, IFN-beta, IL-2, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, factor del crecimiento semejante a la insulina, del tipo 1 (IGF-1), antígeno KC4, antígeno KS-1, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUM-1/2, MUM-3, NCA66,

- NCA95, NCA90, cáncer mucinoso del páncreas, factor de crecimiento placentario, p53, PLAGL2, fosfatasa ácida prostática, PSA, PRAME, PSMA, P1GF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, survivina, survivina-2B, TAC, TAG-72, tenascina, receptores TRAIL, TNF-alfa, antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, VEGFR, fibronectina ED-B, WT-1, antígeno 17-1A, factores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, un marcador de angiogénesis, bcl-2, bcl-6, Kras, cMET, un marcador de oncogenes, y un producto de oncogenes (véase, por ejemplo, a dicho efecto, el trabajo de Sensi, et al., publicado en Clin. Cancer Res. 12 (2006) 5023 - 5032; el trabajo de Parmiani, et al., publicado en J. Immunol. 178 (2007) 1975 - 1979; y el trabajo de Novellino, et al., publicado en Cancer Immunol. Immunother. 54 (2005) 187 - 207).
- Así, de este modo, los anticuerpos que reconocen receptores de superficie celular específicos, incluyendo a sus ligandos, pueden utilizarse para la objetivización y unión específica y selectiva a un gran número / multitud de marcadores de superficie celulares, los cuales se encuentran asociados con una enfermedad. Un marcador de superficie celular, es un polipéptido localizado sobre la superficie de una célula (tal como, por ejemplo, la consistente en una célula relacionada con una enfermedad), a saber, por ejemplo, asociada con un evento de señalización o unión a un ligando.
- En una forma de presentación, para el tratamiento de tumores / cánceres, se utilizan moléculas de unión, multiespecíficas / anticuerpos biespecíficos, los cuales objetivizan, como dianas, a antígenos asociados con tumores, tal y como se reporta por parte de Herberman, en "Herberman, "Immunodiagnosis of Cancer", - Inmunodiagnosis del cáncer -, por parte de Fleisher (ed.), en "The Clinical Biochemistry of Cancer", - La bioquímica clínica del cáncer" -, página 347 (American Association of Clinical Chemists, - Asociación Americana de químicos clínicos-), (1979)), y las patentes estadounidenses U S 4. 150. 149; U S 4. 361. 544; y U S 4. 444. 744.
- Los informes los cuales reportan sobre los antígenos asociados con tumores (TAAs), incluyen al trabajo de Mizukami, et al., publicado en (Nature Med. 11 (2005) 992 - 997); al trabajo de Hatfield, et al., publicado en (Curr. Cancer Drug Targets 5 (2005) 229 - 248); al trabajo de Vallbohmer, et al., publicado en (J Clin. Oncol. 23 (2005) 3536 - 3544); y al trabajo de Ren, et al., publicado en (Ann. Surg. 242 (2005) 55 - 63), los cuales se incorporan aquí, en este documento de solicitud de patente, a título de referencia, con respecto a los TAAs identificados.
- Allí, en donde, la enfermedad, involucra a un linfoma, a una leucemia, o a un desorden o trastorno autoinmune, los antígenos objetivizados como diana, pueden seleccionarse de entre el grupo consistente en los CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD54, CD67, CD74, CD79a, CD80, CD126, CD138, CD 154, CXCR4, B7, MUC1 ó 1a, HM1.24, HLA-DR, tenascina, VEGF, P1GF, fibronectina ED-B, un oncogén, un producto de oncogén (tal como, por ejemplo, c-met ó PLAGL2), CD66a-d, antígenos de necrosis, IL-2, T101, TAG, IL-6, MIF, TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5).
- Se conoce un gran número de anticuerpos biespecíficos, los cuales están dirigidos contra dos diferentes objetivos o dianas, tales como los BCMA/ CD3, diferentes antígeno de la familia HER, en combinación (EGFR, HER2, HER3), CD19/CD3, IL17RA/IL7R, IL-6/IL-23, IL-1-beta/IL-8, IL-6 ó IL-6R/ IL-21 ó IL-21R, primera especificidad dirigida a un glicoeptopo a un antígeno, seleccionado de entre el grupo consistente las estructuras de Lewis x, de Lewis b, y de Lewis y, estructuras Globo H, KH1, antígeno Tn, antígeno TF y estructuras de hidratos de carbono de mucinas, glicolípidos y glicosfingolípidos, tales como los Gg3, Gb3, GD3, GD2, Gb5, Gm1, Gm2, sialiltetraosilceramida, y una segunda especificidad, dirigida contra un receptor tirosina quinasa ErbB, seleccionado de entre el grupo consistente en los EGFR, HER2, HER3 y HER4, GD2, en combinación con un sitio de unión a un antígeno, el cual se encuentra asociado con una célula inmunológica, seleccionada de entre el grupo consistente en los linfocitos T, las células NK, los linfocitos B, las células dendríticas, los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos, las células madre mesenquimales, las células madre neurales, ANG2 / VEGF, VEGF / PDGFR-beta, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el receptor 2/CD3, PSMA/CD3, EPCAM/CD3, las combinaciones de un antígeno seleccionado de entre el grupo consistente en los VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FLT3, c-FMS/CSFIR, RET, c-Met, EGFR, Her2/neu, HER3, HER4, IGFR, PDGFR, c-KIT, BCR, integrina y MMPs, con un ligando soluble en agua, seleccionado de entre el grupo consistente en los VEGF, EGF, PIGF, PDGF, HGF, y la angiopoyetina, ERBB-3/C-MET, ERBB-2/C-MET, EGF-receptor 1/CD3, EGFR / HER3, PSCA / CD3, C-MET/CD3, ENDOSIALINA / CD3, EPCAM / CD3, IGF-1R / CD3, FAPALPHA / CD3, EGFR / IGF-1R, IL 17A/F, EGF-receptor 1/CD3, y CD19/CD16.
- Así, de este modo, se ha encontrado el hecho consistente en que, mediante la utilización de una propuesta de procedimiento modular, tal y como se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, pueden proporcionarse anticuerpos terapéuticos, biespecíficos, personalizados (es decir, hechos a medida). Estos anticuerpos, son personalizados o hechos a medida, con respecto a las moléculas de superficie celulares, las cuales se encuentren efectivamente presentes, en las células de un individuo, el cual se encuentre en necesidad de un tratamiento, o con respecto a los ligandos los cuales interactúan con una molécula de superficie celular de este tipo. Mediante la determinación del estatus de la molécula de superficie celular, de un individuo, puede elegirse una combinación de dianas u objetivos terapéuticos, hecha a medida o personalizada.

Mediante esta generación personalizada o confeccionada a medida de terapéuticas biespecíficas, mediante la combinación de 2 moléculas terapéuticas individuales, para la objetivización como dianas y unión a diferentes epítopos, puede esperarse un efecto aditivo / sinérgico, en comparación con las moléculas terapéuticas individuales.

- 5 Mediante la utilización de entidades de unión terapéutica, monoespecíficas, la cuales se encuentran ya disponibles, tales como aquéllas derivadas de anticuerpos epítopos, puede lograrse y llevarse a cabo una producción rápida y sencilla, de la molécula de unión multiespecífica que se requiera.

- 10 Estas moléculas / anticuerpos de unión de aversez, diseñadas, pueden unirse a uno o más marcadores de superficie, los cuales se encuentren presentes en una célula individual. Esta unión, es solamente ávida, si todas / ambas entidades de unión, se unen, de una forma simultánea, a una célula. Para este propósito, son especialmente apropiados, anticuerpos de afinidad media a baja. Este hecho, permite, por otro lado, el excluir combinaciones menos específicas de especificidades de unión, durante un proceso de exploración de rastreo.

- 15 Las moléculas de unión multiespecífica, específicas de un paciente, la cuales se hayan seleccionado, pueden someterse a tests de ensayo, en varios ensayos in vitro celulares / muestras de células, para criterios relevantes (tales como, por ejemplo, uniones óptimas / compañeros óptimos, longitud óptima del engarce, etc.):

- determinando el estatus de fosforilación de las fosfo-tirosina quinasas
- determinando la inhibición de la quinasas c-Jun N-terminal (JNK)
- determinando la apoptosis inducida por la molécula
- realización de un ensayo de unión, el cual se lleve a cabo con un molécula de unión, monoespecífica, versus monoespecífica.

- 30 Mediante tal tipo de propuesta de procedimiento, es posible la generación de moléculas terapéuticas personalizadas (hechas a medida), y así, de este modo, altamente eficientes. Estas moléculas, tendrán unos efectos secundarios reducidos, mediante una objetivización o focalización / suministro (tal como, por ejemplo, de la carga útil para células tumorales), y una objetivización o focalización mejorada de la célula diana, en base a una mayor selectividad y especificidad del componente de objetivización de la diana (que comprende, por lo menos, dos moléculas de unión).

- 35 La mayor selectividad y especificidad de la molécula de unión (aversez), multiespecífica, es debida a la (aversez de) unión simultánea, mediante la combinación de dos ligantes de unión, de baja "afinidad", lo cual reduce posibles uniones fuera de rango (que se aparten de la diana objetivizada).

Procedimientos que se reportan aquí

- 40 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un procedimiento para producir un anticuerpo biespecífico, el cual comprende la etapa de incubar

- 45 (i) un fragmento de anticuerpo Fab, o un anticuerpo scFv, el cual comprende, en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos),

(ii) un fragmento de anticuerpo, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo,

- 50 en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno,

- 55 en donde, la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos, de oligoglicina, en su extremo terminal N. se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y

en donde, la región Fc de cadena pesada de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos de oligoglicina, en su extremo N-terminal,

- 60 y

(iii) una enzima Sortasa A,

- 65 y, así, de este modo, producir el anticuerpo biespecífico.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se da a conocer un procedimiento para producir un cuerpo biespecífico, el cual comprende las siguientes etapas:

- 5 (i) determinar los marcadores de superficie, los cuales se encuentran presentes en la superficie de una célula, en una muestra, y seleccionar, de entre éstos, un primer marcador de superficie y un segundo marcador de superficie,

- (ii) incubar (a) una primera entidad de unión, un fragmento Fab de anticuerpo, o un fragmento scFv de anticuerpo, el cual comprende, en los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01), en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, (b) un fragmento de anticuerpo, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno, el cual se une, de una forma específica, al segundo marcador específico de superficie, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos de la oligoglicina, en su extremo N-terminal, y (c) una enzima Sortasa A,

20 y, así, de este modo, producir la molécula de unión multiespecífica.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se da a conocer un procedimiento para determinar una combinación de entidades de unión a un antígeno, la cual comprende las siguientes etapas:

- 25 (i) determinar la especificidad y / o selectividad y / o afinidad y / o función efectora, de unión, y / o vida media in vivo, de una multitud de anticuerpos biespecíficos, preparados mediante la combinación de cada uno de los miembros, a una primer multitud de los fragmentos Fab de anticuerpo, o los fragmentos de anticuerpo scFv, con cada miembro, de una segunda multitud de fragmentos de anticuerpos, comprendiendo una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo,

en donde, la primer multitud, se une, de una forma específica, a una primera molécula de superficie celular, y la segunda multitud, se une, de una forma específica, a una segunda superficie celular,

35 y

- (ii) elegir el anticuerpo biespecífico, con una apropiada especificidad y / o selectividad y / o afinidad y / o función efectora, de unión, y / o vida media, in vivo, y determinando, con ello, una combinación de sitios de unión al antígeno.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la combinación, se caracteriza por la incubación del fragmento de anticuerpo Fab o fragmento de anticuerpo scFv, y el fragmento de anticuerpo, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, con una enzima Sortasa A.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende, en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos)

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, de un fragmento de anticuerpo de una sola ramificación, son cadenas de anticuerpo, cognadas, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno, el cual se une, de una forma específica, al segundo marcador de superficie, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos de la oligo-glicina, en su extremo terminal N.

El fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende, en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02), en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con $n = 1, 2 \text{ ó } 3$.

En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende, en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales,

la secuencia de aminoácidos GSLPX1TGGSGS (SEQ ID NO: 03, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos).

5 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos X2GSLPX1TGGSGS (SEQ ID NO: 05, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos), en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, en donde, X2, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, excepto G.

10 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TGGSGSX3 (SEQ ID NO: 06, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con $n = 1, 2 \text{ ó } 3$), en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, en donde, X3, es una secuencia de aminoácidos tag.

15 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos X2GSLPX1TGGSGSX3 (SEQ ID NO: 07, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos), en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, excepto G, y en donde, X3, es una secuencia de aminoácidos tag.

20 En una forma de presentación de todos los aspectos, en concordancia con la presente invención, el polipéptido de la región Fc de cadena pesada de anticuerpo, comprende dos residuos de glicina en su extremo terminal N.

El fragmento de anticuerpo Fc, de una sola ramificación, comprende la secuencia de aminoácidos GGCPX4C (SEQ ID NO: 08), en el extremo N-terminal de su cadena pesada, en donde, X4, es S ó P.

25 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, X1 es E.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre una molécula de unión multiespecífica / un anticuerpo de unión biespecífico, obtenido mediante un procedimiento el cual se da a conocer aquí.

30 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre una molécula de unión, multiespecífica / un anticuerpo de unión, biespecífico, los cuales comprenden la secuencia de aminoácidos LPX1TG (SEQ ID NO: 01, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos), en una de sus cadenas pesadas.

35 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la molécula de unión, multiespecífica / el anticuerpo de unión, biespecífico, comprende la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, en donde, $n = 1, 2 \text{ ó } 3$), en una de sus cadenas pesadas.

40 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la molécula de unión, multiespecífica / el anticuerpo de unión, biespecífico, comprende la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TGGCPX4C (SEQ ID NO: 09, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, en donde, X4, puede ser S ó P, con $n = 1, 2, \text{ ó } 3$), en una de sus cadenas pesadas.

45 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la molécula de unión, multiespecífica / el anticuerpo de unión, biespecífico, comprende la secuencia de aminoácidos X2GSLPX1TGGCPX4C (SEQ ID NO: 10, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, en donde, X4, puede ser S ó P), en una de sus cadenas pesadas, en donde, X2, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, excepto G.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, X1, es E.

50 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre una formulación farmacéutica, la cual comprende una molécula de unión, multiespecífica / un anticuerpo de unión, biespecífico, de la forma la cual se da a conocer aquí.

55 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre el uso de una molécula de unión, multiespecífica / un anticuerpo de unión, biespecífico, de la forma la cual se da a conocer aquí, en la fabricación de un medicamento.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el medicamento, es para el tratamiento del cáncer.

60 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un procedimiento para tratar a un individuo, el cual está afectado de cáncer, procedimiento éste, el cual comprende la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad efectiva de una molécula de unión, multiespecífica / un anticuerpo de unión, biespecífico, de la forma la cual se da a conocer aquí, en este documento de solicitud de patente.

65 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un procedimiento para la destrucción de células

cancerosas, en un individuo, procedimiento éste, el cual comprende la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad efectiva de una molécula de unión, multispecífica / un anticuerpo de unión, biespecífico, de la forma la cual se da a conocer aquí, en este documento de solicitud de patente.

- 5 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, es una región Fc, humana, o una variante de ésta.

- 10 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo humano, es de la subclase IgG1, humana, o de la subclase IgG2, humana, o de la subclase IgG3, humana, o de la subclase IgG4, humana. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo, es una región Fc de la subclase IgG1, humana, o de la subclase IgG4, humana.

- 15 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, comprende una mutación de un residuo de aminoácidos, de origen natural, de por lo menos uno de las siguientes posiciones de aminoácidos, 228, 233, 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 329, y / ó 331, a un residuo diferente, en donde, los residuos, en la región Fc de anticuerpo, se enumeran, en concordancia con el índice de Kabat, de la Unión Europea (EU index de Kabat).

- 20 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo humano, comprende una mutación del residuo de aminoácidos, de origen natural, en la posición 329, y por lo menos una mutación adicional, de por lo menos un residuo de aminoácidos, seleccionado de entre el grupo el cual comprende los residuos de aminoácidos, en la posición 228, 233, 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, y 331, a un residuo diferente, en donde, los residuos, en la región Fc, se enumeran, en concordancia con el índice de Kabat, de la Unión Europea (EU index de Kabat). El cambio de estos residuos de aminoácidos específicos, tiene como resultado una
25 modificación de la función efectora de la región Fc, en comparación con la región Fc, no modificada (del tipo salvaje).

- 30 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo humano, tiene una afinidad reducida a los FcγRIIIA, y / ó FcγRIIA, y / ó FcγRI, en comparación con un conjugado el cual comprenda la correspondiente región IgG Fc, del tipo salvaje.

- 35 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el residuo de aminoácidos, en la posición 329, en la región Fc humana, se encuentra sustituido por glicina, o arginina, o un residuo de aminoácidos el cual sea lo suficientemente grande, como para destruir el sándwich de prolina, en el ámbito de la región Fc.

- 40 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la mutación del residuo de aminoácidos, de origen natural, es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, P329G, y / o P331S. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la mutación, es L234A y L235A, si la región Fc, es de la subclase IgG humana, ó S228P y L235E, si la región Fc, es de la subclase IgG4, humana. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de anticuerpo, comprende la mutación P329G.

- 45 Mediante la combinación de dos mutaciones, en posiciones definidas, en la región Fc, puede conseguirse una reducción completa de la función efectora asociada con la región Fc.

La selección de una región Fc, la cual es efectora, y la cual provoque una función efectora, dependerá del uso el cual se pretende, de las moléculas de unión multispecífica / los anticuerpos biespecíficos.

- 50 En el caso en el que, el uso deseado de la neutralización funcional de una diana objetivizada como objetivo, puede seleccionarse entonces una subclase de variante, la cual provoque una función no efectora.

En el caso en el que, el uso deseado, sea el consistente en la eliminación de una diana (soluble) objetivizada como objetivo, deberá entonces seleccionarse una subclase que provoca una función efectora, o una variante de ésta.

- 55 En el caso en el que, el uso deseado, sea el consistente en la antagonización de una unión a una célula, objetivizada como diana, deberá entonces seleccionarse una subclase la cual provoque una función no efectora, o una variante de ésta.

- 60 En el caso en el que, el uso deseado, sea el consistente en la eliminación de una célula que se presente como diana objetivizada como objetivo, deberá entonces seleccionarse una subclase la cual provoque una función efectora, o una variante de ésta.

La media vida circulante de un anticuerpo, de un conjugado de la región Fc de un anticuerpo, puede verse influenciada mediante la modulación de una interacción región Fc – FcRn.

65

La minimización, o incluso la eliminación de la citotoxicidad mediatizada por células, dependiente de un anticuerpo (ADCC), y la citotoxicidad dependiente de un complemento (CDC), puede conseguirse mediante cambios / sustituciones de aminoácidos de la así denominada región bisagra.

- 5 La minimización, o incluso la eliminación de la actividad de la cascada de un complemento, clásica, puede conseguirse mediante cambios / sustituciones de aminoácidos de la así denominada región bisagra.

Un incremento de la vida media circulante, de un anticuerpo, o de un conjugado de la región Fc de un anticuerpo, puede conseguirse mediante una unión incrementada del receptor Fc neonatal, y éste tiene como resultado una
10 eficacia incrementada, una dosis o frecuencia reducida de la administración, o un suministro incrementado a la diana objetivizada como objetivo. Una reducción de la vida media circulante, de un anticuerpo, o de un conjugado de la región Fc de un anticuerpo, puede conseguirse mediante una unión reducida del receptor Fc neonatal, y ésta tiene como resultado, una exposición reducida del cuerpo, en su totalidad, a un factor de relación incrementado de la unión diana – a no diana.

15 De una forma general, el procedimiento, tal y como éste se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, es susceptible de poderse aplicar a la producción de conjugados de una región Fc de un anticuerpo, la cual comprende una región Fc del tipo salvaje, o un región Fc modificada / variante.

20 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, es una región Fc, humana.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, es “conceptual”, y, mientras que, ésta no existe físicamente, el técnico especialista, el cual diseña el anticuerpo, puede decidir sobre la región Fc variante, a ser utilizada.

25 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el ácido nucleico que codifica a la región Fc, la cual es parte del conjugado de una región Fc de un anticuerpo, se modifica, con objeto de generar una secuencia de aminoácidos variante, la cual codifique a una región Fc variante, la cual forma parte de un conjugado de la región Fc del anticuerpo.

30 El ácido nucleico el cual codifica a la secuencia de aminoácidos de la región Fc que forma parte del conjugado de la región Fc de un anticuerpo, puede prepararse mediante una variedad de procedimientos, los cuales son conocidos, en el arte especializado de la técnica. Estos procedimientos, incluyen, sin bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a la preparación mediante mutagénesis dirigida al sitio (o mediatizada por oligonucleótidos), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de un DNA previamente preparado, que codifique a los polipéptidos de un conjugado de la
35 región Fc de un anticuerpo.

La región Fc, interactúa con un gran número de receptores o ligandos, incluyendo, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los receptores Fc (tal como, por ejemplo, los receptores FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA), la proteína
40 del complemento, C1q, y otras moléculas, tales como las consistentes en las proteínas A y G. Estas interacciones, son esenciales, para una gran variedad de funciones efectoras, y de eventos de señalización corriente abajo, incluyendo, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a la citotoxicidad mediatizada por células, dependiente de un anticuerpo (ADCC)), a la fagocitosis celular dependiente de un anticuerpo (ADCP), y a la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

45 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc de un anticuerpo (según se produce mediante el procedimiento el cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente), tiene por lo menos una de las siguientes propiedades: una función efectora, reducida o eliminada (ADCC y / o CDC y / o ADCP), receptores de unión reducida o eliminada, a los receptores Fc, unión reducida o eliminada, a la C1q, ó toxicidad reducida o eliminada.
50

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc de un anticuerpo (según se produce mediante el procedimiento el cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente), comprende una región Fc del tipo salvaje, la cual tiene por lo menos dos mutaciones, adiciones o
55 eliminaciones de aminoácidos.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc de un anticuerpo (según se produce mediante el procedimiento el cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente), tiene una reducida afinidad a un receptor Fc humano (FcγR), y / o un receptor de complemento, humano,
60 comparado con un anticuerpo o conjugado de la región Fc humana de un anticuerpo, que comprenda una región Fc, humana, del tipo salvaje.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc de un anticuerpo (según se produce mediante el procedimiento el cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente), tiene una afinidad reducida, a por lo menos un FcγRI, FcγRII, y / o FcγRIIIA. En una forma de presentación,
65

en concordancia con la presente invención, la afinidad a los FcγRI y FcγRIIIA, se encuentra reducida. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la afinidad a los FcγRI, FcγRII, y FcγRIIIA, se encuentra reducida.

- 5 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la afinidad a los FcγRI, FcγRIIIA, y a la C1q, se encuentra reducida.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la afinidad a los FcγRI, FcγRII, FcγRIIIA, y a la C1, se encuentra reducida.

- 10 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc de un anticuerpo (según se produce mediante el procedimiento el cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente), tiene una ADCC reducida, en comparación con una anticuerpo o conjugado Fc de un anticuerpo, en comparación con una región Fc del tipo salvaje. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la ADDC, se encuentra reducida, en un porcentaje de por lo menos un 20%, en comparación con la ADDC inducida mediante un polipéptido de fusión, o conjugado, de la región Fc, el cual comprenda una región Fc del tipo salvaje.

- 20 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc de un anticuerpo (según se produce mediante el procedimiento el cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente), tiene una ADCC y CDC, inducida mediante la región Fc, la cual se encuentra reducida o eliminada, en comparación con un conjugado de la región Fc de un anticuerpo, el cual comprenda una región Fc del tipo salvaje.

- 25 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc de un anticuerpo (según se produce mediante el procedimiento el cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente), tiene una ADCC, una CDC y una ADCP reducidas, en comparación con un conjugado de la región Fc de un anticuerpo, el cual comprenda una región Fc del tipo salvaje.

- 30 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc de un anticuerpo, comprende por lo menos una sustitución de aminoácido, en la región Fc, el cual se encuentra seleccionado de entre el grupo que comprende a los S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, P329G, y P331S.

- 35 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc del tipo salvaje, es una región Fc de la IgG1, humana, o una región Fc de la IgG4, humana.

- 40 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc de un anticuerpo, comprende, además de una mutación del residuo de aminoácido prolina, en la posición 239, por lo menos una adición, mutación, o supresión de un residuo de aminoácidos, en la región Fc, la cual se encuentra correlacionada con una estabilidad incrementada de un conjugado de la región Fc de un anticuerpo.

- 45 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la adición, mutación o supresión adicional de un residuo de aminoácidos, en la región Fc, es en la posición 228 y / o 235 de la región Fc, si la región Fc, es de la subclase IgG4. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el residuo de aminoácidos, serina, en la posición 228 y / o el residuo de aminoácidos, leucina, en la posición 235, se encuentra / se encuentran sustituidos por otro aminoácido. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc de un anticuerpo, comprende un residuo de prolina, en la posición 228 (mutación del residuo de serina a un residuo de prolina). En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el conjugado de la región Fc del anticuerpo, comprende un residuo de ácido glutámico, en la posición 235 (mutación del residuo de leucina, a un residuo de ácido glutámico).

- 50 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, comprende tres mutaciones de aminoácidos. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, las tres mutaciones de aminoácidos, son una mutación de los P329G, S228P y L235E (P329G / SPLE).

- 55 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la adición, mutación o supresión de un residuo de aminoácidos, en la región Fc, es en la posición 234 y / o 235 de la región Fc, si la región Fc, es de la subclase IgG1. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el residuo de aminoácidos leucina, en la posición 234 y / o el residuo de aminoácidos, en la posición 235, se encuentra / se encuentran mutados a otro aminoácido.

- 60 En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, comprende una mutación de aminoácidos, en la posición 234, en donde, el residuo de aminoácidos leucina, se encuentra mutado a un residuo aminoácido de alanina.

65

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, comprende una mutación de aminoácidos, en la posición 235, en donde, el residuo de aminoácidos leucina, se encuentra mutado a un residuo aminoácido de alanina.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, comprende una mutación de aminoácidos, en la posición 329, en donde, el residuo de aminoácidos prolina, se encuentra mutado a un residuo de aminoácidos glicina, una mutación de aminoácidos en la posición 234, en donde, el residuo de aminoácidos leucina, se encuentra mutado, a un residuo de aminoácidos alanina, y una mutación de aminoácidos en la posición 235, en donde, el residuo de aminoácidos leucina, se encuentra mutado a residuo de aminoácidos alanina.

La variantes de la región Fc, con una afinidad incrementada para los FcRn, tienen unas vidas medias en suero, más largas y, tales tipos de moléculas, tendrán unas aplicaciones de utilidad, en procedimientos para tratar mamíferos, en donde se desee una prolongada vida media sistémica, del conjugado de la región Fc del anticuerpo, el cual se administre, tal como, por ejemplo, para tratar un desorden o trastorno crónicos, o enfermedad crónica.

Los conjugados de la región Fc de un anticuerpo, con una afinidad de unión los FcRn disminuida, tienen unas vidas medias en suero más cortas, y tales tipos de moléculas, tendrán aplicaciones de utilidad en los procedimientos para tratar a los mamíferos, allí en donde se desee una vida media sistémica más corta del conjugado de la región Fc de un anticuerpo, administrado, tal como, por ejemplo, para evitar los efectos tóxicos secundarios, o para las aplicaciones de diagnóstico mediante imágenes. Lo polipéptidos o conjugados de fusión de la región Fc, con una afinidad de unión a los FcRn incrementada, tienen menos probabilidad de cruzar la placenta, y así, de este modo, éstos pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades o trastornos o desórdenes, en mujeres embarazadas.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la regiones Fc con una afinidad de unión modificada para los FcRn, se trata de un región Fc, con una modificación de aminoácidos, en una o más posiciones de aminoácidos, consistentes en las posiciones 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 y / ó 447.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, se trata de una región Fc, con una o más modificaciones de las posiciones de aminoácidos, consistentes en las posiciones 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439, y / ó 447.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, las regiones Fc, la cuales exhiben una unión incrementada a los FcRn, comprenden las posiciones de aminoácidos, consistentes en las 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, y / ó 434.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, es una región Fc de la subclase IgG1, y ésta comprende las mutaciones de aminoácidos, P329G y / o L234A y L235A.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc, es una región Fc de la subclase IgG1, y ésta comprende las mutaciones de aminoácidos P329G, y / ó S228P y L235E.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc del anticuerpo, comprende la mutación T366W, en el primer polipéptido de la región Fc de cadena pesada, y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el segundo polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, en donde la enumeración (numeración), es en concordancia con el índice EU de Kabat.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la región Fc del anticuerpo, comprende la mutación S354C, en el primer polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, y la mutación Y349C, en el segundo polipéptido de la región Fc de cadena pesada.

Conjugación enzimática, mediante la utilización de la Sortasa A

Un anticuerpo biespecífico el cual comprende un anticuerpo de una sola ramificación (OA-Fc), y uno o más dominios de unión al antígeno, puede obtenerse mediante la utilización de una enzima Sortasa A.

Muchas bacterias gram positivas, utilizan la sortasa para anclar, de una forma covalente, una variedad de proteínas de superficie, incluyendo factores de virulencia, a su pared celular (peptidoglicano). Las sortasas, son enzimas asociadas a una membrana celular. La staphylococcus aureus Sortase A (SrtA) del tipo salvaje, es un polipéptido de 206 aminoácidos, con un región que abarca a la membrana N-terminal. En una primera etapa, la sortasa A, reconoce proteínas de sustrato, las cuales contienen un motivo de una secuencia de aminoácidos LPX1TG, y segmenta el enlace de amida, entre los Thr y Gly, por mediación de un sitio activo Cys. Esta reacción de segmentación o escisión del péptido, tiene como resultado un intermediario tioéster de la sortasa A. en una segunda etapa, el intermediario de la acil-enzima tioéster, se redisuelve mediante un ataque nucleofílico de un grupo amino

del segundo polipéptido del sustrato con contenido de oligoglicina (correspondiente a la unidad de pentaglicina de peptidoglicano en la *S. aureus*), conduciendo a una proteína de la pared celular unida de una forma covalente, y a la regeneración de la sortasa A. En la ausencia de nucleófilos de oligoglicina, el intermediario de acil-enzima, se hidroliza mediante una molécula de agua.

5 La ligación / conjugación mediatizada por la sortasa, se ha empezado a aplicar para el diseño de una variedad de proteínas, y propósitos de bioconjugación. Esta nueva técnica, posibilita la introducción de funcionalidades naturales e innaturales, en los polipéptidos LPX1TLPX-etiquetado, recombinantes, o químicamente sintetizados. Los ejemplos, incluyen a la unión covalente de polímeros derivatizados de la oligoglicina (tal como, por ejemplo, PEG), los
10 fluoróforos, las vitaminas, (tal como, por ejemplo, biotina y folato), los lípidos, los hidratos de carbono, los ácidos nucleicos, los péptidos sintéticos y las proteínas sintéticas (tal como, por ejemplo, GEP) (véase, a dicho efecto, el trabajo de Tsukiji, S. y Nagamune, T., publicado en ChemBioChem 10 (2009) 787 - 798; y el trabajo de Popp, M.W.-L. y Ploegh, H.L., publicado en Angew. Chem. Int. Ed. 50 (2011) 5024 - 5032).

15 Se ha mostrado el hecho de que, una triglicina e, incluso un motivo de diglicina, del componente aminoácido, es suficiente, para la etapa de ligadura mediatizada por SrtA (véase, a dicho efecto, el trabajo de Clancy, K.W., et al., publicado en Peptide Science 94 (2010) 385 - 396).

20 Para la conjugación enzimática, puede utilizarse una sortasa A truncada, soluble, exenta de la región que abarca a la membrana (SrtA; residuos de aminoácidos 60 - 206 de *Staphylococcus aureus* SrtA) (véase, a dicho efecto, el trabajo de Ton-That, H., et al., publicado en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 12424 - 12429; y el trabajo de Ilangovan, H., et al., publicado en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 6056 - 6061). La variante de sortasa A, truncada, soluble, pueden producirse en *E. coli*.

25 Una región Fc de un anticuerpo, la cual comprende una oligoglicina, en por lo menos uno de sus extremos N-terminales (G_m , $m = 2, \text{ ó } 3, \text{ ó } 4, \text{ ó } 5$), puede expresarse y purificarse, a partir del sobrenadante de células eucariotas (tal como, por ejemplo, células HEK293, células CHO).

30 Una entidad de unión (tal como, por ejemplo, un polipéptido de unión a un antígeno, de cadena individual, tal como un scFv, un scFab, o una darpina, o polipéptido de unión a un antígeno, de cadena múltiple, tal como un dsFv ó un Fab), la cual comprenda un motivo de reconocimiento SrtA, en el extremo C-terminal de una cadena de polipéptido, puede expresarse y purificarse, a partir del sobrenadante de células eucariotas (tal como, por ejemplo, la células HEK293, las células CHO).

35 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se reporta sobre un anticuerpo biespecífico, el cual se obtiene mediante la conjugación de un polipéptido / dominio de unión a un antígeno (tal como, por ejemplo, scFv, scFab), a una variante de anticuerpo de una sola ramificación (OA-Fc) mediante la utilización de la Sortasa A, en donde, la secuencia de reconocimiento de la sortasa, se encuentra localizada en el extremo C-terminal del polipéptido de
40 unión al antígeno, de cadena individual (tal como, por ejemplo, scFv, scFab, ó darpina), o el extremo C-terminal de una cadena de polipéptido de un complejo de unión al antígeno, de cadena múltiple (tal como, por ejemplo, dsFv ó Fab), y en donde, un motivo de glicina, doble o triple, se encuentra localizado en el extremo N-terminal de la cadena Fc, de una variante de anticuerpo de una sola ramificación ((OA-Fc- G_m ; $m = 2 \text{ ó } 3$). Un conjugado Fab ó scFv del anticuerpo de una sola ramificación el cual comprende un fragmento Fab de anticuerpo (OA-Fc~Fab) o un fragmento de anticuerpo, scFv (OA-Fc~scFv) y un anticuerpo de una sola ramificación (OA-Fc), puede obtenerse, mediante un
45 alto rendimiento productivo, en una conjugación enzimática, mediante la utilización de (i) un polipéptido, el cual comprende una secuencia de aminoácidos $G_n\text{SLPX1TG}$ (SEQ ID NO:02, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con $n = 1, 2, \text{ ó } 3$), en su región del extremo C-terminal, (ii) un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, el cual comprende una oligoglicina, en su extremo N-terminal, y (iii) la enzima Sortasa A.

50 Mediante esta combinación de reactivos

i) la reacción inversa la cual reconoce a la secuencia de aminoácidos LPX1TG, en el producto conjugado como sustrato, y / o

55 ii) la generación de un fragmento de polipéptido de hidrólisis de punto muerto (polipéptido sin una secuencia de reconocimiento LPX1TG, o bien con secuencia de LPX1TG segmentada o escindida, generada a través de la segmentación o escisión de la entidad de unión al tioacilo, Sortasa A, inmediatamente, mediante agua, en lugar del nucleófilo de la región Fc del anticuerpo G_m)

60 que acontecen, de una forma normal, en tiempos de reacción incrementados, puede reducirse o incluso eliminarse.

Se ha procedido a someter, a test de ensayo, diferentes combinaciones de secuencias de aminoácidos C-terminales y N-terminales.

En mayor detalle, como una entidad de unión ejemplar, se procedió a utilizar un fragmento Fab, y como una región Fab de anticuerpo, ejemplar, se procedió a utilizar una región Fc de anticuerpo de una sola ramificación (región OA-Fc = un par de una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total), y su cadena ligera cognada o afín, y un polipéptido de la región Fc, de un anticuerpo, de cadena pesada). Se procedió a conjugar tres diferentes secuencias en el extremo C-terminal, de la cadena VH-CH1 del fragmento Fab de anticuerpo, y en extremo N-terminal de la región OA-Fc, respectivamente, mediante la utilización de la transpeptidasa Sortasa A. Se consiguieron nueve diferentes conjugados. Se procedió a determinar el progreso / eficiencia de la reacción de acoplamiento, en diferentes puntos de tiempo. Con esta finalidad, se procedió a analizar la regiones de transpeptidación, mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida, con dodecilsulfato sódico [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a sodium dodecyl Sulfate polyacrylamid gel electrophoresis] -). La eficacia de la ligadura, se determinó mediante procedimiento de densitometría, a partir de gel. Los resultados obtenidos, se encuentran recopilados en la Tabla 1, la cual se facilita abajo, a continuación.

Tabla 1

Región Fc de anticuerpo, de una sola ramificación (→)	GGGDKTHTCPPC	GGHTCPPC	GGCPPC
Cadena pesada Fab VH-CH1 (↓)			
KSCGGGSLPETGGSGSHHHHHH	aprox. 54 %	aprox. 62 %	aprox. 73 %
KSCGSLPETGGSGSHHHHHH	aprox. 56 %	aprox. 56 %	aprox. 73 %
KSCLPETGGSGSHHHHHH	aprox. 52 %	aprox. 54 %	aprox. 54 %

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el fragmento de anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos GSLPX1TGGSGS (SEQ ID NO: 03, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con n = 1, 2 ó 3), en el ámbito de los 20 residuos de aminoácidos C-terminales.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el fragmento de anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos X2GSLPX1TGGSGS (SEQ ID NO: 05, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos), en donde X2, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, excepto G.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el fragmento de anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos G_nSLPX1TGGSGSX3 (SEQ ID NO: 06, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con n = 1, 2 ó 3), en el ámbito de los 20 residuos de aminoácidos, C-terminales, en donde, X3, es una secuencia de aminoácidos tag.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el fragmento de anticuerpo Fab, o el fragmento de anticuerpo scFv, comprende la secuencia de aminoácidos X2GSLPX1TGGSGSX3 (SEQ ID NO: 07, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con n = 1, 2 ó 3), en el ámbito de los 20 residuos de aminoácidos, C-terminales, en donde, X2, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, excepto G, y X3, es una secuencia de aminoácidos tag (etiqueta de secuencia peptídica).

Propuesta de procedimiento de matriz combinada

Es deseable el hecho de combinar una primera entidad de enlace o unión, tal como la consistente en un fragmento Fab de anticuerpo, con otra entidad de enlace o unión, específica, tal como la consistente en un fragmento Fab de un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de una sola ramificación, la cual comprende una cadena pesada de longitud total, y su cadena ligera cognada o afín, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, unido a disulfuro. De una forma adicional, es posible el proceder a efectuar una exploración de rastreo, para averiguar el hecho de si, una primera entidad de unión, muestra unas propiedades mejores, cuando ésta se une o enlaza a un gran número de otras diferentes entidades de unión. Mediante la utilización de una propuesta de procedimiento, al cual se le denomina como procedimiento "Combimatrix (procedimiento de matriz combinada), puede procederse a abordar una multitud de combinaciones de entidades de unión o enlace, de una forma muy sencilla. Deberá no obstante tomarse debida nota, en cuanto al hecho consistente en que, las segundas entidades de enlace o unión, pueden unirse o enlazarse, bien ya sea a diferentes dianas / epítopos / antígenos, o bien, éstas pueden unirse o enlazarse al mismo antígeno, pero a diferentes epítopos, o bien, al mismo antígeno, pero a diferentes variantes, de una entidad de unión o enlace individual (tales como, por ejemplo, candidatos de humanización).

En este escenario, una plataforma automatizada, puede realizar las tareas de pipetear, purificación y combinar las entidades de enlace o unión, y sus reacciones o derivados. Es apropiada, para realizar este cometido, cualquier plataforma, la cual utilice, por ejemplo, placas de 96 pozos, u otros formatos de mayor rendimiento productivo, tales como el consistente en un robot de pipeteado, del tipo "Eppendorf epMotion 5075vac pipetting robot".

En primer lugar, se procede a realizar las construcciones de codificación de las entidades de enlace o unión. Los plásmidos con los ácidos nucleicos que codifican a las unidades de unión o enlace, se obtienen, de una forma usual, mediante síntesis genética (síntesis de genes), a cuyo efecto, la región C-terminal, de una entidad de enlace o unión codificada, contiene un motivo sortasa, y una His-tag, y una región N-terminal de la entidad de unión de la otra respectiva entidad de unión, comprende un motivo o formación de oligoglicina, o mediante la clonación de los dominios variables, vía PRC de células B, y clonación independiente de ligadura (SLIC), a un vector apropiado, el cual contenga los elementos necesarios, tales como los consistentes en la región constante, un motivo de sortasa, y una His-tag (etiqueta His), respectivamente. Los plásmidos, se transfieren, de una forma individual, al interior de un pozos separado de una placa de múltiples pozos (puede cargarse una placa completa). A continuación, los plásmidos, se digieren con una mezcla de enzimas de restricción, la cual recorta y separa a la región de codificación de la entidad en cuestión. Es deseable el hecho de diseñar la síntesis de la totalidad de los genes, de una forma, la cual, únicamente se necesite una mezcla de enzimas de reacción, para la totalidad de los plásmidos. Subsiguientemente, una etapa opcional de purificación, proporciona los fragmentos de DNA purificados. Estos fragmentos, se ligan al interior de una cadena o esqueleto de plásmido, el cual se ha recortado, separándolo, de un vector aceptor, con la misma mezcla de restricción que la que se ha mencionado anteriormente, arriba. De una forma alternativa, el procedimiento de clonación, puede realizarse mediante una etapa de clonación, mediatizada por SLIC (véase, a dicho efecto, por ejemplo, el procedimiento de prioridad / patente europea, PCT/EP2012/076155). Después del ligado, la plataforma automatizada, transfiere todas las mezclas de ligado, al interior una placa de pozos múltiples, adicional, con células E. coli, competentes (tal como, por ejemplo, del tipo Top10 Multi Shot, Invitrogen), y se realiza una reacción de transformación. La totalidad de las células, se cultivan a la densidad deseada.

A partir de un alícuoto de la mezcla de cultivo en cuestión, puede obtenerse una mezcla de stocks de glicerol. A partir del cultivo, se procede a aislar el plásmido (tal como, por ejemplo, mediante la utilización de un miniequipo de aislamiento de plásmido, a modo de "mini-kit" (tal como, por ejemplo, un equipo de ensayo, a modo de kit, del tipo NucleoSpin 96 Plasmid, Macherey& Nagel)). Se procede a comprobar la identidad de los plásmidos, mediante la digestión de un alícuoto, con una mezcla de restricción apropiada, y una electroforesis en gel de poliácridamida, (tal como, por ejemplo, E-Gel 48, Invitrogen). Subsiguientemente, puede procederse a carga una nueva placa, con una alícuoto del plásmido, para llevar a cabo una reacción de secuenciación, de control.

En la siguiente etapa, se procede a expresar las entidades de enlace o unión. Así, por lo tanto, se procede a sembrar las células HEK, en una placa de pozos múltiples (tal como, por ejemplo, la consistente en una placa de 48 pozos), o pequeños matraces de agitación y éstas se transfieren con los plásmidos aislados), los cuales contienen la región de codificación de la entidad, en un vector de cadena o esqueleto apropiado). Las células HEK transfectadas, se cultivan, durante un transcurso de tiempo de varios días, y éstas se recolectan (tal como, por ejemplo, mediante filtración, a través de una placa de filtro de 1,2 µm y 0,22 µm, mediante la utilización de una estación de vacío). Los títulos, pueden controlarse, procediendo a llevar a cabo un ensayo ELISA.

Las entidades de unión, pueden unirse, las unas con las otras, mediante la utilización de una reacción de transpeptidación, mediatizada por sortasa. La primera entidad de unión, la segunda entidad de unión, y la mezcla de reacción de sortasa, pueden combinarse, en un formato de pozos múltiples. Después de haber procedido a un proceso de incubación, a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo de 4 – 74 horas (tal como, por ejemplo, durante un transcurso de tiempo de 16 horas), puede procederse a la recolección de los conjugados, mediante la utilización de un procedimiento de selección His-tag, negativo (la mezcla, se aplica, por ejemplo, en placas del tipo "His MultiTrap HP plates" (GE Healthcare) y a su filtrado, a cuyo efecto, todas las moléculas las cuales tienen todavía un His-tag (etiqueta His), se encuentran unidas o enlazadas a la columna de cromatografía, mientras que, los conjugados, se encuentran en el filtrado; en donde, el filtrado de un cambio de tampón, debe llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la aplicación del conjugado sobre una membrana de ultrafiltración, o mediante la utilización de una placa, la cual contenga un medio de afinidad, el cual sea específico para una de las entidades de unión.

Las moléculas de unión multiespecíficas, pueden confeccionarse, mediante la utilización de la propuesta de procedimiento "Combimatrix". Véase a dicho efecto, la Tabla que se facilita abajo, a continuación.

Las moléculas de unión multiespecíficas, pueden confeccionarse, mediante la utilización de la propuesta de procedimiento "Combimatrix". Véase a dicho efecto, la Tabla que se facilita abajo, a continuación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A	10A	11A
B	1B
C	1C
D	1D
E	1E
F	1F
G	1G	10G	11G

En la primera fila de una placa de múltiples pozos, se procede a pipetear (es decir, a aplicar mediante una pipeta), diferentes primeras entidades de unión, las cuales comprenden un motivo de sortasa C-terminal, de iguales concentraciones molares, en cada uno de los pozos (excluyendo al primer pozo de la primera fila), los cuales se designan mediante números arábigos (tal como, por ejemplo, del 1 a 11). En la primera columna, de la misma placa, se pipetea (es decir, a aplicar mediante la ayuda de una pipeta) diferentes segundas entidades de unión, las cuales comprenden una oligoglicina, en la región N-terminal, de iguales concentraciones molares, al interior de cada pozo (excluyendo el primer pozo de la primera columna), las cuales se designan en letras (tal como, por ejemplo, desde la letra A hasta la letra G). A continuación, se procede a combinar las primeras unidades de unión, de la primera fila, con la totalidad de las segundas entidades de unión de la primera columna (tal como, por ejemplo, dando como resultado 77 combinaciones, en una placa de 96 pozos), designadas mediante una combinación de números y de letras (tal como, por ejemplo, desde 1 A, hasta 11 G). Se procede a añadir Sortasa, a todas las combinaciones, en un tampón apropiado. Después de que se haya realizado la conjugación enzimática, puede llevarse a cabo una etapa opcional de purificación. Las moléculas de unión multispecíficas, se encuentran, entonces, listas para la evaluación, en ensayos basados en células.

III. PROCEDIMIENTOS RECOMBINANTES

Los componentes de ligadura, de un conjugado de la región OA-Fc, de una forma particular, la variante de anticuerpo de una sola ramificación o brazo (OA-FcGm), y el polipéptido de unión al antígeno, de cadena individual (tal como por ejemplo, los consistentes en los scFv, scFab ó darpina), o el complejo de unión al antígeno, de cadena múltiple (tal como, por ejemplo, los consistentes en los dsFv ó Fab), pueden producirse mediante la utilización de procedimientos y composiciones recombinantes, véase, a dicho efecto, la patente estadounidense U S 4. 816. 567.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporciona un procedimiento para la producción de un conjugado de polipéptido ~OA-FC, en donde, el procedimiento en cuestión, comprende (i) cultivar una primer célula huésped, la cual comprende un ácido nucleico que codifica a la parte de una variante de anticuerpo de una sola ramificación o brazo (OA-Fc-Gm), del conjugado, bajo unas condiciones, las cuales son apropiadas para la expresión / secreción, de una variante de anticuerpo de una sola ramificación o brazo (OA-Fc-Gm), y de una forma opcional, recuperar la parte de OA-Fc-Gm, de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped), y (ii) cultivar una segunda célula huésped, la cual comprende un ácido nucleico, el cual codifica a la parte de polipéptido del conjugado, bajo unas condiciones, las cuales sean apropiadas para la expresión / secreción del polipéptido, y de una forma opcional, recuperar la parte del polipéptido de la célula huésped para un polipéptido (o del medio de cultivo de la célula huésped), y (iii) conjugar las partes recombinantemente producidas de conjugado de polipéptido ~OA-Fc, enzimáticamente, mediante la utilización de una transpeptidación mediatizada por la Sortasa A.

Para la producción recombinante de la parte OA-Fc-Gm de un conjugado de polipéptido ~OA-Fc, y la parte del polipéptido, se procede a aislar un ácido nucleico que codifique a la parte OA-Fc-Gm y la parte del polipéptido de conjugado polipéptido ~OA-Fc, tal y como por ejemplo, de la forma la cual se encuentra descrita anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, y éste se inserta en uno o más vectores, para clonar y / o para la expresión / secreción, de una forma adicional, en una célula huésped. Tal tipo de ácido nucleico, puede fácilmente aislarse y / o producirse, mediante la utilización de procedimientos convencionales.

Las células huésped apropiadas, para la clonación o expresión / secreción de vectores los cuales codifiquen a polipéptidos, incluyen a las células procarióticas y a las células eucarióticas, al cuales se encuentran descritas aquí, en este documento de solicitud de patente. Así, por ejemplo, los polipéptidos, pueden producirse en bacterias, de una forma particular, cuando la glicosilación y la función efectora Fc, no son necesarias (véase, por ejemplo, a dicho efecto, las patentes estadounidenses U S 5. 648. 237, U S 5. 789. 199, y U S 5. 840. 523, así como el trabajo de Charlton, publicado en *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 245 - 254 (B.K.C. Lo, (ed.), Humana Press, Totowa, NJ), en donde, se describe una expresión de fragmentos de anticuerpos, en *E. coli*). Después de la expresión, el polipéptido, puede aislarse, a partir de la pasta de células bacterianas, en una fracción soluble, o éste puede aislarse a partir de los así denominados cuerpos de inclusión, de la fracción insoluble, el cual puede solubilizarse y redoblarse a formas activas. Subsiguientemente, puede procederse a la purificación adicional del polipéptido.

De una forma adicional a los procariotas, los microbios eucarióticos, tales como los consistentes en los hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes apropiados para la clonación o para la expresión de huéspedes, para los vectores que codifican a los vectores, incluyendo a las cepas de hongos y a las cepas de levaduras o fermentos, cuyas trayectorias de glicosilación, se hayan "humanizado", dando como resultado la producción de un polipéptido, con un modelo patrón de glicosilación, parcialmente o completamente humano (véase, a dicho efecto, por efecto, el trabajo de Gerngross, publicado en *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409 - 1414, y el trabajo de Li, et al., publicado en *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210 - 215).

Las células huésped las cuales son apropiadas, para la expresión de los polipéptidos glicosilados, se derivan así mismo, también, a partir de organismos multicelulares (organismos multicelulares invertebrados y organismos celulares vertebrados). Los ejemplos de células de organismos invertebrados, incluyen a las células de las plantas y

a las células de los insectos. Se han identificado numerosas cepas vaculovirales, las cuales se han utilizado en conjunción con las células de insectos, de una forma particular, para la transfección de las células *Spodoptera frugiperda*.

- 5 Los cultivos de las células de plantas, pueden también utilizarse como huéspedes (véase, por ejemplo, a dicho efecto, las patentes estadounidenses U S 5. 959. 177, U S 6. 040. 498, U S 6. 420. 548, U S 7. 125. 978, y U S 6. 417. 429 (en donde se describe la tecnología PLANTIBODIES™, para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

- Las células de vertebrados, pueden ser utilizadas como huéspedes. Así, por ejemplo, pueden ser de utilidad, a dicho efecto, líneas celulares de mamíferos, las cuales se encuentren adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos, son las consistentes en la línea celular COS-7 (la célula del riñón de mono, CV1, transformada mediante (el virus) SV40; la línea celular HEK293 (riñón embrionario humano); la línea celular BHK (de la cría de hámster), la línea celular sertoli del ratón, TM4 (células TM4, según se describen éstas, por ejemplo, mediante el trabajo de Mather, publicado en Biol. Reprod. 23 (1980) 243 - 251); la línea celular CV1 (célula del riñón del mono); la línea celular VERO-76 (célula del riñón del mono verde africano); la línea celular HELA (célula del carcinoma cervical humano); la línea celular MDCK (célula del riñón canino), la línea celular BRL-3A (célula del hígado de la rata búfalo); la línea celular W138 (célula del pulmón humano), la línea celular HepG2 (célula del hígado humano); la línea celular MMT 060562 (célula del tumor mamario del ratón); la línea celular TRI (según se describe ésta, por ejemplo, en el trabajo de Mather, et al., publicado en Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44 - 68; la línea celular MRC5; y las líneas celulares FS4. Otras líneas celulares huéspedes, de mamíferos, las cuales con de utilidad, incluyen a la línea celular CHO (célula del ovario del hámster chino), incluyendo a las líneas celulares DHFR, y CHO negativas (véase, a dicho efecto, el trabajo de Urlaub, et al., publicado en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216), y las líneas celulares del mieloma, tales como las consistentes en la línea celular Y0, en la línea celular NS0 y en la línea celular Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares huéspedes, de mamíferos, las cuales son apropiadas para la producción de polipéptidos, véase, por ejemplo, del trabajo de Yazaki, y Wu, publicado en Methods in Molecular Biology, Antibody Engineering, - Procedimientos en biología molecular, diseño de anticuerpos -, 248 (2004) 255 - 268 (B.K.C. Lo, (ed.), Humana Press, Totowa, NJ).

IV. Procedimientos y composiciones para la diagnosis y para la detección

- 30 En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, cualesquiera de los anticuerpos biespecíficos, los cuales se proporcionan aquí, en este documento de solicitud de patente, son de utilidad para detectar la presencia de uno o de ambos antígenos, en una muestra biológica. El término "detectar", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, abarca a la detección cuantitativa o la detección cualitativa. En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, una muestra biológica, comprende una célula o un tejido, tales como las biopsias o células cancerosas.

- En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, se proporciona un anticuerpo biespecífico, para su uso en un procedimiento de diagnosis o de detección. Aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporciona un procedimiento para la detección de la presencia de células cancerosas, en una muestra biológica. En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, la procedimiento, comprende el proceder a poner en contacto la muestra biológica, con un anticuerpo biespecífico, de la forma la cual se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, bajo unas condiciones permisivas para la unión del anticuerpo específico a su anticuerpo biespecífico, a su antígeno o antígenos, y detectar el hecho de si se forma un complejo, entre el anticuerpo biespecífico y su antígeno o antígenos. Tal tipo de procedimiento, puede ser un procedimiento in vitro, o puede ser un procedimiento in vivo.

- Los trastornos o desórdenes ejemplares los cuales pueden ser diagnosticado, mediante la utilización de un anticuerpo, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, incluyen al cáncer.

- 50 En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, se proporcionan anticuerpos biespecíficos, marcados (etiquetados). Los marcajes o etiquetas, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a marcadores o etiquetas, o porciones, las cuales se detectan de una forma directa (tales como los consistentes en los marcajes o etiquetajes fluorescentes, cromofóricos, electrones densos, y radioactivos), así como a las porciones, tales como las consistentes en las enzimas o en los ligandos, los cuales se detectan de una forma indirecta, tal como, por ejemplo, mediante una reacción enzimática, o mediante una interacción molecular. Los marcadores o etiquetas ejemplares, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los radioisótopos ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, y ¹³¹I, a los fluoróforos, tales como los quelatos de tierras raras, o la fluoresceína y sus derivados, al dansilo, a la umbeliferona, a las luciferinas, tales como, por ejemplo, la luciferasa de la luciérnaga y la luciferasa bacteriana (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense U S 4. 737. 456), a la luciferina, a las 2,3-dihidroftalazindionas, a la peroxidasa del rábano picante (HRP - [de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a horseradish peroxidase] -), a la fosfatasa alcalina, a la β-galactosidasa, a la glucoamilasa, a la lisozima, a las oxidasas sacarídicas, tales como, por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, a las oxidasas heterocíclicas, tales como la uricasa y la xantina oxidasa, acopladas con un enzima, la cual emplea peróxido de hidrógeno, para oxidar un precursor de colorante, tal como la

HRP, la lactoperoxidasa, o la microperoxidasa, a la biotina / avidina, a los marcadores o etiquetas de espín, a los marcadores o etiquetas de bacteriófagos, a los radicales libres estables, y por el estilo.

V. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo biespecífico, tal y como éstas se describen aquí, en este documento de solicitud de patente, se preparan procediendo a mezclar un anticuerpo tal, el cual tenga el grado deseado de pureza, con uno o más portadores o soportes opcionales, farmacéuticamente aceptables (véase, a dicho efecto, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, Osol, A. (ed.), (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o en forma de soluciones acuosas. Los portadores o soportes farmacéuticamente aceptables son, de una forma general, no tóxicos, para los receptores o destinatarios de las formulaciones farmacéuticas en cuestión, a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y éstos incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos: a los tampones, tales como los tampones fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos, a los antioxidantes, incluyendo al ácido ascórbico y a la metionina; a los conservantes (tales como los consistentes en el cloruro octadecil-dimetilbencil-amónico; en el cloruro de hexametonio, en el cloruro de benzalconio, en el cloruro de benzetonio, en el fenol, en el alcohol fenílico o alcohol bencílico; en los alquilparabenos, tales como el metilparabeno o el metilparabeno; en el catecol, en el resorcinol, en cicloexanol; en el 3-pentanol; y en el m-cresol); a los polipéptidos de bajo peso molecular, (de menos de aproximadamente 10 residuos); a las proteínas, tales como la consistente en la albúmina de suero, la gelatina o las inmunoglobulinas; a los polímeros hidrofílicos; a los polímeros hidrofílicos, tales como, la poli(vinilpirrolidona); a los aminoácidos, tales como los consistentes en la glicina, en la glutamina, en la asparagina, en la histidina, en la arginina, o en la lisina; a los monosacáridos, a los disacáridos, y a otros hidratos de carbono, incluyendo a la glucosa, a la manosa, o a las dextrinas; a los agentes quelantes, tales como los consistentes en el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); a los azúcares, tales como los consistentes en sacarosa, en el manitol, en la trehalosa o en el sorbitol; a las sales las cuales forman contraiones, tales como los consistentes en el sodio, en los complejos metálicos (tales como, por ejemplo, los consistentes en los complejos de Zn-proteínas); y / o a los tensioactivos o surfactantes, no iónicos, tales como los consistentes en el polietilenglicol (PEG). Los portadores o soportes farmacéuticamente, ejemplares, incluyen, aquí, este documento de solicitud de patente, a los agentes de dispersión intersticial de los fármacos, tales como los consistentes en las glicoproteínas de hialuronidasa neutras / activas, solubles (sHASEGP), tales como, por ejemplo, las glicoproteínas de hialuronidasa PH-20, solubles, humanas, tales como la consistente en la rhuPH20 (HYLENEX®, de la firma Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGPs y procedimientos apropiados para su uso, la cuales incluyen a la huPH20, se encuentran descritas en las patentes estadounidenses U S 2005 / 0 260 186 y la patente estadounidense U S 2006 / 0 104 968. Una sHASEGP, puede combinarse con una o más glicosaminoglicanasas, tales como las consistentes en las condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpos liofilizados ejemplares, se encuentran descritas en la patente estadounidense U S 6. 267. 958. Las formulaciones de anticuerpos, acuosas, incluyen a aquéllas las cuales se encuentran descritas en la patente estadounidense US 6. 171. 586, y en la patente internacional WO 2006 / 044 908, incluyendo, las últimas formulaciones, un tampón de histidina – acetato.

Las formulaciones las cuales se proporcionan aquí, en este documento de solicitud de patente, pueden también contener, así mismo, más de un ingrediente activo, de la forma la cual sea necesaria, para la indicación particular que se esté tratando, pudiendo contener, de una forma preferible, a aquéllos ingredientes activos con actividades complementarias, las cuales no influyan, afectando de una forma adversa, las unas con respecto a las otras. Tales tipos de ingredientes activos, se encuentran presentes, de una forma apropiada, en unas cantidades las cuales sean efectivas para los propósitos los cuales se pretendan.

Los ingredientes activos, pueden encontrarse atrapados en microcápsulas, las cuales se preparan, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación, o mediante polimerización interfacial, tal como, por ejemplo, las microcápsulas consistentes en las microcápsulas de hidroximetilcelulosa o en las microcápsulas de gelatina y en las microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (tales como, por ejemplo, los consistentes en los liposomas, las microesferas de albúmina, las microemulsiones, las nanopartículas, y la nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales tipos de técnicas, se dan a conocer, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, - Ciencia farmacéuticas, de Remington – 16ª edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida, incluyen a las matrices semipermeables, de polímeros hidrofóbicos, las cuales contienen el anticuerpo, matrices éstas, las cuales son en forma de artículos conformados, tales como, por ejemplo, los consistentes en películas o films, o en microcápsulas.

Las formulaciones a ser utilizadas, para la administración in vivo, de una forma general, son estériles. La esterilidad, puede realizarse, de una forma sencilla, por ejemplo, mediante la filtración a través de membranas de filtrado.

VI. Procedimientos terapéuticos y composiciones

Cualesquiera de los anticuerpos biespecíficos, los cuales se proporcionan aquí, en este documento de solicitud de patente, pueden ser utilizados en procedimientos terapéuticos.

5 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporciona un anticuerpo biespecífico, para su uso como un medicamento. Se proporciona, aquí, en este documento de solicitud de patente, un anticuerpo biespecífico para el tratamiento del cáncer. En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, se proporciona un anticuerpo biespecífico, para su uso en un procedimiento de tratamiento. En ciertas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, las cuales se proporcionan aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporciona un anticuerpo biespecífico, para su uso en un procedimiento para tratar a un individuo, el cual se encuentre afectado de cáncer, el cual comprende la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad efectiva del anticuerpo biespecífico. En una forma de presentación de este tipo, en concordancia con la presente invención, el procedimiento, comprende, de una forma adicional, la administración, a un individuo, de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, tal como, por ejemplo, de la forma la cual se describe posteriormente, abajo, en este documento de solicitud de patente. En formas adicionales de presentación, en concordancia con la presente invención, aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporciona un anticuerpo biespecífico, para su uso en la supresión / eliminación / lisado de células cancerosas. En determinadas formas adicionales de presentación, en concordancia con la presente invención, aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporciona un anticuerpo biespecífico, para su uso en un procedimiento para la supresión / eliminación / lisado de células cancerosas, en un individuo, el cual comprende la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad del cuerpo biespecífico, para suprimir / eliminar / lisar las células cancerosas. Un "individuo", en concordancia con una cualquiera de las formas de presentación anteriormente proporcionadas, arriba, en este documento de solicitud de patente, puede ser un humano.

25 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporciona un anticuerpo biespecífico, para su uso en la fabricación de un medicamento, o en la preparación de un medicamento. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el medicamento, es para el tratamiento del cáncer. En otras formas de presentación, en concordancia con la presente invención, el medicamento en cuestión, es para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer, el cual comprende la administración, a un individuo el cual se encuentre afectado de cáncer, de una cantidad efectiva del medicamento. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el procedimiento, comprende, de una forma adicional, la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, tal como, por ejemplo, de la forma la cual se ha descrito posteriormente, abajo, en este documento de solicitud de patente. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el medicamento, es para la supresión / eliminación / lisado de células cancerosas. En una forma adicional de presentación, en concordancia con la presente invención, el medicamento, es para su uso en un procedimiento para suprimir / eliminar / lisar las células cancerosas. Un "individuo", en concordancia con una cualquiera de las formas de presentación anteriormente proporcionadas, arriba, en este documento de solicitud de patente, puede ser un humano.

40 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporciona un procedimiento para tratar el cáncer. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el procedimiento, comprende la administración, a un individuo el cual se encuentra afectado de cáncer, de una cantidad efectiva de un anticuerpo biespecífico. En una forma de administración de este tipo, en concordancia con la presente invención, el procedimiento, comprende, de una forma adicional, la administración, a un individuo, de una cantidad efectiva, de por lo menos un agente terapéutico adicional, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente. Un "individuo", en concordancia con una cualquiera de las formas de presentación anteriormente proporcionadas, arriba, en este documento de solicitud de patente, es un humano.

50 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporcionan un procedimiento para suprimir / eliminar / lisar células cancerosas, en un individuo. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, el procedimiento, comprende la administración, al individuo en cuestión, de una cantidad efectiva del anticuerpo biespecífico, para suprimir / eliminar / lisar la células cancerosas. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, un "individuo", es un humano.

55 Aquí, en este documento de solicitud de patente, se proporcionan formulaciones, la cuales comprenden uno cualquiera de los anticuerpos los cuales se proporcionan aquí, en este documento de solicitud de patente, tal como, por ejemplo, para sus en uno cualquiera de los procedimientos terapéuticos los cuales se han citado anteriormente, arriba. En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, una formulación farmacéutica, comprende uno cualquiera de los anticuepos biespecíficos, los cuales se proporcionan aquí, en este documento de solicitud de patente, y un portador o soporte farmacéuticamente aceptable. En otra forma de presentación, una formulación farmacéutica, comprende uno cualquiera de los anticuerpos biespecíficos, los cuales se proporcionan aquí, en este documento de solicitud de patente, y por lo menos un agente terapéutico adicional, tal como, por ejemplo, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba.

65 Los anticuerpos, tal y como éstos se reportan aquí, en este documento de solicitud de patente, pueden utilizarse, o bien ya sea solos, o bien ya sea en combinación con otros agentes, en una terapia. Así, por ejemplo, un anticuerpo,

de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, puede coadministrarse con por lo menos un agente terapéutico adicional. En determinadas formas de presentación, en concordancia con la presente invención, un agente terapéutico adicional, es un agente citotóxico, o un agente quimioterapéutico.

- 5 Tales tipos de terapias de combinación las cuales se han anotado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, abarcan a la administración separada (en donde, dos o más agentes terapéuticos, se encuentran incluidos en la misma formulación, o en formulaciones separadas), y a la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, puede acontecer previamente, o simultáneamente y / o a continuación de la administración del agente terapéutico y / o adyuvante adicional. Los anticuerpos, de la forma la cual éstos se reportan aquí, en este documento de solicitud de patente, pueden también utilizarse en combinaciones, con una terapia de radiación.

Un anticuerpo, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente (y cualquier agente terapéutico adicional), puede administrarse mediante cualquier medio el cual sea apropiado, incluyendo a la administración parenteral, a la administración intrapulmonar, y a la administración intranasal y, en caso deseado, para la el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales, incluyen a la administración intramuscular, a la administración intravenosa, a la administración intraarterial, a la administración intraperitoneal, y a la administración subcutánea. La dosificación, puede llevarse a cabo mediante cualquier tipo de vía o ruta la cual sea apropiada, tal como, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como las consistentes en las inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, del hecho consistente en si, la administración, es breve, o ésta es crónica. Aquí, en este documento de solicitud de patente, se contemplan varios tipos de programas de dosificación, incluyendo, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstas, a las administraciones individuales o a las administraciones múltiples, en varios puntos de tiempo, en la administración de bolos, y la infusión por pulsos.

- 25 Los anticuerpos, de la forma la cual éstos se reportan aquí, en este documento de solicitud de patente, se formularán y se administrarán, de una forma consistente, con una buena práctica médica. Los factores a ser considerados en este contexto, incluyen al desorden o trastorno particular el cual se esté tratando, al mamífero particular el cual se esté tratando, a la condición clínica del paciente individual, a la causa del trastorno o desorden, al sitio de suministro del agente, al procedimiento de administración, al programa de administración, y a otros factores, los cuales son conocidos por parte de los médicos practicantes especialistas. El anticuerpo, no necesita ser formulado con uno o más agentes usualmente utilizados para prevenir o evitar, o tratar, el desorden o trastorno en cuestión, pero sin embargo, no obstante, de una forma opcional, se formula con éstos. La cantidad efectiva de tales otros agentes, depende de la cantidad de anticuerpo la cual se encuentre presente en la formulación, del tipo de trastorno o desorden o de tratamiento, y de otros factores, los cuales se han discutido anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente. Éstos se utilizan, de una forma general, en las mismas dosificaciones y mediante las mismas vías o rutas de administración, la cuales se encuentran descritas aquí, en este documento de solicitud de patente, o bien, a una tasa correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 99 %, de las dosificaciones las cuales se encuentran descritas aquí, en este documento de solicitud de patente, o bien, en cualquier dosificación o mediante cualquier tipo de vía o ruta, la cual se determine, de una forma clínica, como siendo apropiada.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de un medicamento, tal y como se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente (cuando éste se utiliza solo, o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, distintos), dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y del curso de la enfermedad, del hecho consistente en si, el anticuerpo, se administra para los propósitos de prevención, o para los propósitos terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente, y de la respuesta al anticuerpo, y de la discreción del médico practicante especialista que esté tratando al paciente. De una forma apropiada, el anticuerpo, se administra, al paciente, de una sola vez, o mediante una serie de tratamientos. En dependencia del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una dosificación de un anticuerpo, correspondiente a una tasa comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde aproximadamente 1 µg / kg, hasta aproximadamente 15 mg / kg (tal como, por ejemplo, una tasas correspondiente a un valor de 0,5 mg / kg – 10 mg / kg), puede considerarse como siendo una dosificación inicial candidata, para la administración, al paciente, mediante, bien ya sea por ejemplo, en una sola administración, o bien ya sea mediante administraciones separadas, o bien ya sea mediante una infusión continua. Una dosificación diaria típica, podría ser la correspondiente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes, los cuales van desde los aproximadamente 1 µg / kg, hasta los aproximadamente 100 mg / kg, o más, en dependencia de los factores anteriormente mencionados, arriba, aquí, en este documento de solicitud de patente. Para las administraciones repetidas, durante un transcurso de tiempo de varios, días, o más prolongadas, y en dependencia de la condición, el tratamiento, de una forma general, sería sostenido, hasta que acontezca la supresión de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo, sería la correspondiente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes, los cuales van desde los aproximadamente 0,05 mg / kg, hasta los aproximadamente 10 mg / kg. Así, de este modo, pueden administrarse, al paciente, una o más dosis correspondientes a aproximadamente 0,5 mg / kg, a aproximadamente 2,0 mg / kg, a aproximadamente 4,0 mg / kg, o a aproximadamente 10 mg / kg (o cualquier combinación de éstas). Tales dosis, pueden administrarse de una forma intermitente, tal como, por ejemplo, cada semana, o bien, cada tres semanas (por ejemplo, de tal forma que, el paciente, reciba desde aproximadamente dos dosis, hasta aproximadamente 20

dosis, tal como, por ejemplo, aproximadamente seis dosis, del anticuerpo). Puede procederse a administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis, más bajas. Un régimen de dosificación ejemplar, comprende la administración, [[déjese añadir, en un régimen de dosificación ejemplar, si se conoce, por ejemplo, "una dosis de carga inicial, correspondiente a una tasa de 4 mg / kg, seguido de una dosis de mantenimiento, semanal, correspondiente a una tasa de 2 mg / kg, del anticuerpo"]]. Sin embargo, no obstante, pueden ser también de utilidad, así mismo, otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia, controla, de una forma fácil, mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entenderá el hecho de que, cualesquiera de entre las formulaciones o procedimientos terapéuticos, los cuales se han descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, pueden llevarse a cabo, mediante la utilización de un inmunoconjugado, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, en lugar de un anticuerpo biespecífico, o adicionalmente a un anticuerpo biespecífico.

VII. Artículos de elaboración

Aquí, en este procedimiento de solicitud de patente, se proporciona un artículo de elaboración, el cual contiene materiales para el tratamiento, la prevención y / o la diagnosis de los desórdenes o trastornos anteriormente mencionados, arriba, en este documento de solicitud de patente. El artículo de elaboración, comprende un recipiente contenedor, y un marcaje o etiqueta, o prospecto incluido en el recipiente contenedor, o asociado con éste. Los recipientes contenedores apropiados, incluyen, por ejemplo, a la botellas, a los viales, a la jeringas, a las a la bolsas de solución IV, etc. Los recipientes contenedores, pueden encontrarse formados a partir de una variedad de materiales, tales como los consistentes en el vidrio o en el plástico. El recipiente contenedor en cuestión, retiene una composición, la cual es, por sí misma, o en combinación con otra composición, efectiva para tratar, para prevenir o evitar y / o para diagnostica la condición, y éste puede tener un puerto o portilla de acceso, estéril (así, por ejemplo, el recipiente contenedor, puede ser el consistente en una bolsa de solución intravenosa, o un vial, los cuales tengan un tapón, el cual sea susceptible de poderse perforar, mediante una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo, en la composición, se trata de un anticuerpo, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente. El marcaje o etiqueta o prospecto insertado, indica el hecho de que, la composición, se utiliza para tratar una condición o trastorno de elección. De una forma adicional, el artículo de elaboración, puede comprender (a) un primer recipiente contenedor, con una composición contenida en su interior, en donde, la composición en cuestión, comprende un anticuerpo, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente; y (b) un segundo recipiente contenedor, con una composición contenida en su interior, en donde, la composición en cuestión, comprende un agente citotóxico adicional, o de otro modo, un agente terapéutico adicional. El artículo de elaboración, en esta forma de presentación, en concordancia con la presente invención, puede comprender, de una forma adicional, un prospecto insertado adicional, indicando el hecho consistente en que, las composiciones, pueden utilizarse para tratar una condición particular. De una forma alternativa, o de una forma adicional, el artículo de elaboración, en esta forma de presentación, en concordancia con la presente invención, puede comprender, de una forma adicional, un segundo (o un tercer) recipiente contenedor, el cual comprenda una tampón farmacéuticamente aceptable, tal como el consistente en agua bacteriostática para inyección (BWFI, - [de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a bacteriostatic water for injection] -). Una solución salina tamponada con fosfato, una solución de Ringer, y una solución de dextrosa. Éste puede incluir, de una forma adicional, otros materiales los cuales sean deseables, desde un punto comercial y desde el punto de vista del usuario, incluyendo a otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entenderá el hecho de que, cualesquiera de los artículos anteriormente descritos, arriba, pueden incluir un inmunoconjugado, de la forma la cual se reporta aquí, en este documento de solicitud de patente, en lugar o adicionalmente a un anticuerpo específico.

Descripción del listado de secuencias:

SEQ ID NO: 01 a 07 y 66 a 67	Motivos de Sortasa
SEQ ID NO: 08	Nucleófilo de la región Fc
SEQ ID NO: 09 a 10	Restos de motivos de Sortase en el conjugado
SEQ ID NO: 11 a 29	Secuencia de aminoácidos tag
SEQ ID NO: 30	Domino CH2 humano
SEQ ID NO: 31	Dominio CH3 humano
SEQ ID NO: 32 a 46	Polipéptidos de la región FC de cadena pesada de anticuerpo
SEQ ID NO: 47 a 65	Secuencias utilizadas en los ejemplos

Ejemplos

Los ejemplos los cuales se facilitan abajo, a continuación, son ejemplos de procedimientos y de composiciones de la presente invención. Se entenderá no obstante el hecho consistente en que pueden practicarse otras formas de presentación, dada la descripción que se ha facilitado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente.

Si bien la invención la cual se ha facilitado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, se ha descrito en algún detalle, a título de ejemplo, a modo de ilustración y de ejemplo, para los propósitos de la claridad de entendimiento, las descripciones y ejemplos facilitados, no deben no obstante considerarse como siendo limitativos del ámbito o alcance de la presente invención.

Materiales y procedimientos

Técnicas de DNA recombinante

Se procedió a utilizar procedimientos para manipular el DNA, de la forma la cual se encuentra descrita por parte de Sambrook, J., et al., en Molecular Cloning: A Laboratory Manual -, Clonación molecular: Un manual de laboratorio; - Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). Los reactivos biológicos moleculares utilizados, se utilizaron mediante la utilización de las instrucciones del fabricante.

Síntesis de genes

Los segmentos de genes deseados, se prepararon mediante síntesis química, en Geneart GmbH (Regensburg, Alemania). Los fragmentos de genes, se clonaron en un plásmido E.coli, para la propagación / amplificación. La secuencia de DNA de los fragmentos de genes subclonados, se verificaron, mediante secuenciación de DNA.

Determinación de las proteínas

La concentración de las proteínas de los polipéptidos purificados, se determinó procediendo a determinar la densidad óptica (OD), a 280 nm, mediante la utilización de un coeficiente de extinción molar, calculado en base a la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Ejemplo 1

Generación de los plásmidos de expresión

Descripción del plásmido de expresión en mamíferos, básico / estándar

Se procedió a expresar las proteínas deseadas, mediante la transfección transitoria de células de riñón humano embrionario (HEK 293). Para la expresión de un gen deseado / una proteína deseada (tal como, por ejemplo, una cadena pesada de cadena de un anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de un anticuerpo, de longitud total, o una cadena de Fc, la cual contenga una oligoglicina, en su extremo N-terminal), se utilizó una unidad de transcripción, la cual comprendía los siguientes elementos funcionales.

- el potenciador temprano inmediato y promotor, procedente del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo al intron A,
- una región no traducida 5' de la inmunoglobulina humana, de cadena pesada (5'UTR),
- una secuencia de señal de cadena pesada, de la inmunoglobulina murina (SS),
- un gen / una proteína, a ser expresada, (tal como, por ejemplo, una cadena pesada de un anticuerpo, de longitud total, y
- la secuencia de poliadenilización de la hormona del crecimiento bovino (BGH pA).

Aparte de la unidad / cassette de expresión, incluyendo el gen deseado a ser expresado, el plásmido de expresión en mamíferos, contenía

- un origen de replicación, a partir del vector pUC18, el cual permite la replicación de este plásmido en E.coli,
- un gen de beta-lactamasa, el cual confiere la resistencia a la ampicilina, en E. coli.

Se procedió a construir plásmidos de expresión, los cuales codifican para los (las) siguientes polipéptidos / proteínas:

- Dominio variable de una cadena pesada de Pertuzumab, combinado con una región constante de cadena pesada, humana, de la subclase IgG1, la cual contiene una mutación T366W:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGLEW
 VADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
 CARNLGPSFYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47).

- Dominio variable de una cadena ligera de Pertuzumab, combinado con una región constante de cadena ligera kappa, humana.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIQVAVYQQKPGKAPKLLIY
 SASRYRTGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPTFG
 QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW

KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 48).

- Dominio variable de una cadena pesada de Trastuzumab, combinado con una región constante de cadena pesada, humana, de la región de la subclase IgG1, que contiene una mutación T366S, L368A, y Y407V:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
 ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
 SRWGGDGFYAMDYWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 49).

- Dominio variable de una cadena ligera de Trastuzumab, combinado con una región constante de cadena ligera kappa, humana.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI
 YSASFLYSGVPSRFGSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF
 GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 50).

- Fragmento Fab de un anticuerpo, el cual comprende el dominio variable de cadena pesada de Pertuzumab, y una región 1, constante, de cadena pesada, humana (CH1), de la subclase IgG1, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal GGGSLPETGGSGSHHHHHH:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGLEW
 VADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
 CARNLGPSFYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGSLPETGGSGSHHHHHH
 (SEQ ID NO: 51).

- Fragmento Fab de un anticuerpo, el cual comprende el dominio variable de cadena pesada de Pertuzumab, y una región 1, constante, de cadena pesada, humana (CH1), de la subclase IgG1, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal GSLPETGGSGSHHHHHH:

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKGLEW
VADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CARNLGPSFYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
10 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSLPETGGSGSHHHHHH
(SEQ ID NO: 52).

15 - Fragmento Fab de un anticuerpo, el cual comprende el dominio variable de cadena pesada de Pertuzumab, y una región 1, constante, de cadena pesada, humana (CH1), de la subclase IgG1, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal LPETGGSGSHHHHHH

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKGLEW
VADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CARNLGPSFYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
25 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCLPETGGSGSHHHHHH (SEQ
ID NO: 53).

- Fragmento Fab de un anticuerpo, el cual comprende el dominio variable de cadena pesada de Trastuzumab, y una región 1, constante, de cadena pesada, humana (CH1), de la subclase IgG1, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal GGGSLPETGGSGSHHHHHH:

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
SRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
35 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGSLPETGGSGSHHHH
HH (SEQ ID NO: 54).

40 - Fragmento Fab de un anticuerpo, el cual comprende el dominio variable de cadena pesada de Trastuzumab, y una región 1, constante, de cadena pesada, humana (CH1), de la subclase IgG1, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal terminal GSLPETGGSGSHHHHHH:

45 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
SRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
50 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSLPETGGSGSHHHHHH
(SEQ ID NO: 55).

55 - Fragmento Fab de un anticuerpo, el cual comprende el dominio variable de cadena pesada de Trastuzumab, y una región 1, constante, de cadena pesada, humana (CH1), de la subclase IgG1, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal LPETGGSGSHHHHHH:

60 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
SRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
65 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCLPETGGSGSHHHHHH
(SEQ ID NO: 56).

- Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)), con una mutación T366S, L368A, y Y407V, que contiene una secuencia N-terminal GGGDKTHTCPPC:

5 GGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKL
10 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 57).

- Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)), con una mutación T366S, L368A, y Y407V, que contiene una secuencia N-terminal GGHTCPPC:

15 GGHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC
20 AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 58).

- Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)), con una mutación T366S, L368A, y Y407V, que contiene una secuencia N-terminal GGCPPC:

25 GGCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA
30 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 59).

- Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)), con una mutación T366W, que contiene una secuencia N-terminal GGGDKTHTCPPC:

35 GGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK
40 NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 60).

- Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)), con una mutación T366W, que contiene una secuencia N-terminal GGHTCPPC:

45 GGHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
50 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 61).

- Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)), con una mutación T366C, que contiene una secuencia N-terminal GGCPPC:

55 GGCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
60 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 62).

65

Ejemplo 2Expresión transitoria, purificación y caracterización analítica

- 5 Las cadenas de anticuerpo, se generaron mediante la transfección transitoria de las células HEK293 (derivadas de la línea celular de riñón humano embrionario), cultivadas en Medio F17 (de procedencia de la firma Invitrogen Corp.). Para la transfección, se utilizó el reactivo de transfección 293-Fectina, consistente en el "293-Fectin -Transfection Reagent "(de procedencia de la firma Invitrogen). Las cadenas de anticuerpo, se expresaron a partir de tres diferentes plásmidos, los cuales codificaban para una cadena pesada de longitud total (bien ya sea de Pertuzumab-knob - [botón de Pertuzumab] -, o bien ya sea de Trastuzumab-hole - [ojal de trastuzumab] -), una correspondiente
- 10 cadena ligera de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, que contienen una de las secuencias de oligoglicina N-terminales, bien ya sea como un botón, o bien ya sea como un ojal. Se procedió a utilizar los tres plásmidos, a un factor de relación de los plásmidos, equimolar, después de la transfección. Las transfecciones, se llevaron a cabo de la forma la cual se encuentra especificada en las instrucciones del fabricante.
- 15 Los sobrenadantes del cultivo celular que contenían la región Fc, se recolectaron siete días después de la transfección. Los sobrenadantes, se almacenaron, en forma congelada, hasta la purificación.

- La región Fc del anticuerpo, que contenía los sobrenadantes del cultivo, se filtró y se purificó, mediante dos etapas de cromatográficas. Las regiones Fc del anticuerpo, se capturaron mediante procedimiento de cromatografía de afinidad, utilizando HiTrap MabSelectSuRe (de procedencia de la firma GE Healthcare), equilibrado con un tampón de PBS (1 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl), pH 7,4. Las proteínas no unidas, se retiraron mediante lavado, mediante un tampón de equilibrio, y la región Fc del anticuerpo, se recuperó con un tampón citrato 0,1 M, pH 3,0. Inmediatamente después de la elución, la solución, se neutralizó a un pH 6,0, con 1 M Tris-base, pH 9,0. Como la segunda etapa de purificación, se procedió a utilizar una cromatografía de exclusión de tamaño, sobre Superdex 200™ (de procedencia de la firma GE Healthcare). La cromatografía de exclusión de tamaño, se llevó a
- 20 cabo en un tampón 40 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5. La regiones Fc del anticuerpo, eluidas, se concentraron con una unidad de filtro centrífugo, del tipo "Ultrafree-CL centrifugal filter", equipado con una membrana del tipo "Biomax-SK membrane" (de procedencia de la firma Millipore, Billerica, MA), y éstas se concentraron, a una temperatura de - 80 °C.

- 30 Las concentraciones de proteínas de las regiones de anticuerpo Fc, se determinaron procediendo a medir la densidad óptica (OD), a 280 nm, mediante la utilización del coeficiente de extinción molar, calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y la formación apropiada de la región Fc, se analizaron mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida, con dodecilsulfato sódico), en presencia y en ausencia de un agente reductor (5 mM 1,4-ditiotreitol), y mediante una tinción de marcaje, con azul brillante de Coomassie.
- 35

Ejemplo 3Expresión transitoria, purificación y caracterización analítica de fragmentos Fab de un anticuerpo, que contienen el motivo C-terminal LPX1TG

- 40 Los fragmentos Fab del anticuerpo, se generaron mediante la transfección transitoria de las células HEK293 (derivadas de la línea celular de riñón humano embrionario), cultivadas en Medio F17 (de procedencia de la firma Invitrogen Corp.). Para la transfección, se utilizó el reactivo de transfección 293-Fectina, consistente en el "293-Fectin -Transfection Reagent "(de procedencia de la firma Invitrogen). Los fragmentos Fab de anticuerpo, se expresaron a partir de dos diferentes plásmidos, los cuales codificaban para una cadena pesada de longitud total (bien ya sea de Pertuzumab-knob - [botón de Pertuzumab] -, o bien ya sea de Trastuzumab-hole - [ojal de trastuzumab] -), y una correspondiente cadena pesada, truncada, que contiene una de las secuencias C-terminales, LPX1TG. Se procedió a utilizar los dos plásmidos, a un factor de relación de los plásmidos, equimolar, después de la
- 45 transfección. Las transfecciones, se llevaron a cabo de la forma la cual se encuentra especificada en las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes del cultivo celular que contenían la región Fc, se recolectaron siete días después de la transfección. Los sobrenadantes, se almacenaron, en forma congelada, hasta la purificación.

- Los fragmentos Fab del anticuerpo, que contenían los sobrenadantes del cultivo, se filtraron y se purificaron, mediante dos etapas de cromatográficas. Los fragmentos Fab, se capturaron mediante procedimiento de cromatografía de afinidad, utilizando columna de HisTrap HP Ni - TA (de procedencia de la firma GE Healthcare), equilibrado con un tampón de PBS y 20 mM Imidazol (1 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 20 mM Imidazol), pH 7,4. Las proteínas no unidas, se retiraron mediante lavado, mediante un tampón de equilibrio. La proteína marcada con histidina, se eluyó con un gradiente lineal de Imidazol, de un valor comprendido dentro de
- 55 unos márgenes que iban desde 20 mM a 400 mM, en PBS (1 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 400 mM Imidazol), pH 7,4, en 10 volúmenes de columna. Como la segunda etapa de purificación, se procedió a utilizar una cromatografía de exclusión de tamaño, sobre Superdex 200™ (de procedencia de la firma GE Healthcare). La cromatografía de exclusión de tamaño, se llevó a cabo en un tampón 40 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5. Los fragmentos Fab, se concentraron con una unidad de filtro centrífugo, del tipo "Ultrafree-CL centrifugal
- 60

filter", equipado con una membrana del tipo "Biomax-SK membrane" (de procedencia de la firma Millipore, Billerica, MA), y éstas se concentraron, a una temperatura de - 80 °C.

Las concentraciones de proteínas de los fragmentos Fab, se determinaron procediendo a medir la densidad óptica (OD), a 280 nm, mediante la utilización del coeficiente de extinción molar, calculado en base a la secuencia de aminoácidos. La pureza y la formación apropiada de los fragmentos Fab, se analizaron mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida, con dodecilsulfato sódico), en presencia y en ausencia de un agente reductor (5 mM 1,4-ditiotreitol), y mediante una tinción de marcaje, con azul brillante de Coomassie.

Ejemplo 4

Ligadura mediatizada por Sortasa A, de una región Fc de un anticuerpo, y entidad de unión (fragmento Fab)

Para la reacción de transpeptidación mediatizada por sortasa, se procedió a utilizar *Staphylococcus aureus* Sortasa A (Δ_{1-59}). La reacción, se llevó a cabo en un tampón, el cual contenía 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 (tampón de Sortasa). En la reacción, se procedió a unir un motivo o formación de sortasa (LPETG) en su extremo C-terminal de la cadena pesada de VH-CH1, no incluyendo o incluyendo 2 diferentes secuencias de aminoácidos, cortas de conexión, entre el extremo C-terminal de la cadena pesada de VH-CH1 (...KSC) y el extremo N-terminal del motivo o formación de sortasa (LPETGGSGSHHHHHH, SEQ ID NO: 63, GSLPETGGSGSHHHHHH, SEQ ID NO: 64, y GGGSLPETGGSGSHHHHHH, SEQ ID NO: 65) y un anticuerpo de una sola ramificación, el cual porta un motivo de oligoglicina, y tres diferentes secuencias bisagra (GGCPPC, SEQ ID NO: 8 con X4 = P, GGHTCPPC, SEQ ID NO: 66, y GGGDKTHTCPPC, SEQ ID NO: 67, respectivamente), en su extremo N-terminal del polipéptido de la región Fc de cadena pesada, dando como resultado un conjugado de la región Fc del anticuerpo. Con objeto de llevar a cabo la reacción, se procedió a aportar todos los en solución, en un tampón de sortasa. En la primera etapa, la región Fc del anticuerpo, y el fragmento Fa del anticuerpo, se mezclaron, y la reacción, se inició, mediante la subsiguiente adición de Sortasa A y 5 mM CaCl_2 . Los componentes, se mezclaron mediante pipeteado (es decir, se añadieron mediante pipeta), y éstos se incubaron, a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo de 72 horas. Subsiguientemente, la reacción, se paró, mediante la congelación de la mezcla de reacción, y el almacenaje, a una temperatura de - 20 °C, hasta el análisis.

Factor de relación molar Fab : anticuerpo de una sola ramificación : sortasa = 20 : 4 : 1

Resultados

Se procedió a conjugar tres diferentes secuencias en el extremo C-terminal del fragmento Fab y en el extremo N-terminal del anticuerpo, respectivamente, mediante la Sortasa A, para obtener nueve diferentes combinaciones de conjugados de la región Fc de anticuerpo. La eficacia de la reacción de acoplamiento, se evaluó, en diferentes puntos de tiempo. Con esta finalidad, se procedió a analizar alícuotas de las reacciones de transpeptidación, mediante SDS-PAGE. La eficacia de la ligadura, se estimó, de una forma densiométrica, a partir de la SDS-PAGE. Los resultados obtenidos, después de un transcurso de tiempo de 72 horas, de la reacción, se encuentran recopilados en la Tabla 2, para las respectivas secuencias.

Tabla 2: Conjugación de los fragmentos Fab con anticuerpos de una sola ramificación

Región Fc de anticuerpo, de una sola ramificación (→)	GGGDKTHTCPPC	GGHTCPPC	GGCPPC
Cadena pesada Fab VH-CH1 (↓)			
KSCGGGSLPETGGSGSHHHHHH	aprox. 54 %	aprox. 62 %	aprox. 73 %
KSCGSLPETGGSGSHHHHHH	aprox. 56 %	aprox. 56 %	aprox. 73 %
KSCLPETGGSGSHHHHHH	aprox. 52 %	aprox. 54 %	aprox. 54 %

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Procedimiento para la selección y la producción de entidades de objetivación, como dianas, altamente selectivas y multiespecíficas, personalizadas, las cuales contienen pó lo menos dos entidades de unión diferentes, y utilización de éstas.

<130> 31069 WO

10 <150> EP12173875.1
<151> 2012-06-27

<160> 67

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

20 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> secuencia de aminoácidos tag, de la sortasa

<220>

<221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)

<222> (3)..(3)

30 <223> X puede ser cualquier residuo de aminoácidos

<400> 1

Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

35 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> secuencia de aminoácidos tag, 2, de la sortasa

<220>

45 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)

<222> (1)..(1)

<223> X = G ó GG ó GGG

<220>

50 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)

<222> (5)..(5)

<223> X = cualquier residuo de aminoácidos

<400> 2

55 Xaa Ser Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

60 <210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> secuencia de aminoácidos tag, 3, de la sortasa

<220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 <222> (5)..(5)
 5 <223> X = cualquier residuo de aminoácidos

<400> 3

	Gly	Ser	Leu	Pro	Xaa	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser
	1				5					10	

10 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos tag, 3a, de la sortasa

<220>
 20 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 <222> (7)..(7)
 <223> X = cualquier residuo de aminoácidos

<400> 4

	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Xaa	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser
	1				5						10		

<210> 5
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos tag, 5, de la sortasa

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 <222> (1)..(1)
 <223> X = cualquier residuo de aminoácidos, excepto G

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE (Característica miscelánea)
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 <222> (7)..(7)
 <223> X = cualquier residuo de aminoácidos

50 <400> 5

	Xaa	Gly	Ser	Leu	Pro	Xaa	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser
	1				5					10		

55 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos tag, 5, de la sortasa

<220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 65 <222> (1)..(1)

<223> X = G, ó GG, ó GGG

<220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 5 <222> (5)..(5)
 <223> X = cualquier residuo de aminoácidos

<220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 10 <222> (12)..(12)
 <223> X = secuencia de aminoácidos tag

<400> 6

	Xaa	Ser	Leu	Pro	Xaa	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Xaa
15	1				5					10		

<210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos tag, 6, de la sortasa

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 <222> (1)..(1)
 <223> X = cualquier residuo de aminoácidos excepto G

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 <222> (6)..(6)
 <223> X = cualquier residuo de aminoácidos

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 <222> (13)..(13)
 <223> X = secuencia de aminoácidos tag

40 <400> 7

	Xaa	Gly	Ser	Leu	Pro	Xaa	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Xaa
45			1				5					10	

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> nucleótido bisagra

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
 <222> (5)..(5)
 <223> X = S, ó P

60 <400> 8

	Gly	Gly	Cys	Pro	Xaa	Cys
	1				5	

65 <210> 9

<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> secuencia de aminoácidos característica de un producto sortasa

<220>
<221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
10 <222> (1)..(1)
<223> X = G, ó GG, ó GGG

<220>
<221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
15 <222> (5)..(5)
<223> X = cualquier residuo de aminoácidos

<220>
<221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
20 <222> (11)..(11)
<223> X = S, ó P

<400> 9

25 Xaa Ser Leu Pro Xaa Thr Gly Gly Cys Pro Xaa Cys
1 5 10

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos, 2, característica de un producto sortasa

35 <220>
<221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
<222> (1)..(1)
<223> X = cualquier residuo de aminoácidos excepto G

40 <220>
<221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
<222> (6)..(6)
<223> X = cualquier residuo de aminoácidos

45 <220>
<221> MISC_FEATURE (CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA)
<222> (12)..(12)
<223> X = S ó P

50 <400> 10

Xaa Gly Ser Leu Pro Xaa Thr Gly Gly Cys Pro Xaa Cys
1 5 10

<210> 11
55 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
60 <223> Arg-tag

<400> 11

Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

65

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Arg-tag 2
 <400> 12
 10 Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5
 <210> 13
 <211> 6
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> His-tag
 20
 <400> 13
 His His His His His His
 1 5
 25 <210> 14
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> aminoácido tag
 <400> 14
 35 Lys Asp His Leu Ile His Asn Val His Lys Glu Phe His Ala His Ala
 1 5 10 15
 His Asn Lys
 <210> 15
 40 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> aminoácido tag
 <400> 15
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 50 <210> 16
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> aminoácido tag
 <400> 16
 60 Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1 5 10 15
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys 20
 65 <210> 17

ES 2 597 228 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> aminoácido tag #

<400> 17

10 Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
 1 5

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> aminoácido tag

20 <400> 18

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

<210> 19
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> aminoácido tag

30 <400> 19

Met Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg
 1 5 10

35 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> aminoácido tag

<400> 20

45 Met Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg Val Pro Leu Val Glu Thr
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 38
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> aminoácido tag

55 <400> 21

Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 1 5 10 15

60 Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
 20 25 30

Gln Gly Gln Arg Glu Pro
 35

65

ES 2 597 228 T3

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> aminoácido tag

<400> 22

10

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aminoácido tag

20

<400> 23

Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
1 5 10 15

25

<210> 18
<211> 8

<210> 24
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aminoácido tag

35

<400> 24

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg
1 5 10 15

40

Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu
20 25

45

<210> 25
<211> 47
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50

<220>
<223> aminoácido tag

<400> 25

55

Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr
1 5 10 15

60

Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser
20 25 30

Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
35 40 45

65

ES 2 597 228 T3

<210> 26
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Butyrivibrio fibrisolvens

5

<400> 26

10

Met Asp Trp Asn Ala Asn Ile Ala Pro Gly Asn Ser Val Glu Phe Gly
 1 5 10 15

Ile Gln Gly Ala Gly Ser Val Gly Asn Val Ile Asp Ile Thr Val Glu
 20 25 30

15

<210> 27
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> dominio de unión a la quitina

<400> 27

25

Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala
 1 5 10 15

30

Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro
 20 25 30

35

His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp
 35 40 45

Gln Leu Gln
 50

40

<210> 28
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Chondrus crispus

45

<400> 28

Met Pro Glu Ile Lys Leu Thr Tyr Phe Asp Met Arg Gly Arg Ala Glu
 1 5 10 15

50

Ala Ser Arg Leu Ala Leu Val Val Gly Glu Ile Pro Phe Glu Asp Glu
 20 25 30

55

Arg Val Val Phe Asp His Trp Lys Glu Ala Lys Pro Lys Thr Pro Tyr
 35 40 45

60

Ala Ala Leu Pro Met Leu Thr Val Asp Gly Met Gln Val Ala Gln Ser
 50 55 60

Asp Ala Ile Leu Arg Tyr Cys Gly Lys Leu Ala Gly Leu Tyr Pro Ser
 65 70 75 80

65

ES 2 597 228 T3

```

5      Asp Pro Leu Glu Ala Ala Lys Val Asp Glu Val Gly Gly Val Ile Asp
      85                      90                      95

10     Asp Val Thr His Ala Met Tyr Arg Tyr Arg Gly Asp Asp Lys Asp Lys
      100                      105                      110

15     Leu Arg Glu Glu Arg Asp Lys Phe Ser Lys Val Asp Val Pro Arg Tyr
      115                      120                      125

20     Val Gly Ala Leu Glu Lys Arg Leu Glu Ala Phe Gly Asp Gly Pro Trp
      130                      135                      140

25     Ala Val Gly Gly Asn Met Thr Ile Ala Asp Leu His Ile Cys His Leu
      145                      150                      155                      160

30     Val Thr Asn Ile Arg Cys Gly Met Leu Asp Phe Val Asp Lys Asp Leu
      165                      170                      175

35     Leu Glu Gly Tyr Val Arg Ile Val Lys Ser Tyr Ser Ala Val Met Glu
      180                      185                      190

40     His Pro Lys Val Thr Glu Trp Tyr Glu Lys Lys Pro Val Lys Met Phe
      195                      200                      205

35     Ser

<210> 29
<211> 396
<212> PRT
40     <213> Escherichia coli

<400> 29

      Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
      1                      5                      10                      15

      Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala Lys Ile Glu Glu Gly Lys
      20                      25                      30

50     Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu
      35                      40                      45

55     Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu
      50                      55                      60

60     His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly
      65                      70                      75                      80

      Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr
      85                      90                      95

```

ES 2 597 228 T3

5 Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln
100 105 110

10 Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys
115 120 125

15 Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn
130 135 140

Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala
145 150 155 160

20 Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn
165 170 175

25 Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly
180 185 190

30 Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly
195 200 205

35 Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu
210 215 220

Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu
225 230 235 240

40 Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp
245 250 255

45 Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val
260 265 270

50 Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu
275 280 285

Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu
290 295 300

55 Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn
305 310 315 320

60 Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu
325 330 335

65 Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys
340 345 350

ES 2 597 228 T3

Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala
 355 360 365
 5 Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp
 370 375 380
 10 Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Arg Ile Thr Lys
 385 390 395
 <210> 30
 <211> 107
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 20 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 25 20 25 30
 Trp Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 30 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 35 Glu Ser Thr Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 65 70 75 80
 40 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 85 90 95
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105
 45 <210> 31
 <211> 106
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 55 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 60 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 65

ES 2 597 228 T3

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

5

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

10

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

15

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 100 105

<210> 32
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 32

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

25

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

35

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

40

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

45

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

50

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

55

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 130 135 140

60

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

65

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

ES 2 597 228 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

5 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

10 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 33
 <211> 222
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con the mutaci6ns L234A, L235A

20 <400> 33

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

25 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

30 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

35 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

40 65 70 75 80

45 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

50 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

55 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 130 135 140

60 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

65 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

ES 2 597 228 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

5 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

10 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 34
 <211> 222
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

20 <223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una mutación de hueco (ojal)
 <400> 34

25 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

30 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

35 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

40 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

45 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

50 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

55 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 130 135 140

60 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

65

ES 2 597 228 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

5 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

10 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

15 <210> 35
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una mutación de botón
 <400> 35

25 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

30 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

35 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

40 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

45 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

50 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

55 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

60 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

65 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 130 135 140

70 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

75 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

5

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

10

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

15

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 36

<211> 222

<212> PRT

20

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una mutación L234A, L235A y de hueco

25

<400> 36

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

30

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

35

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

40

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

45

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

50

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

55

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

60

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

65

ES 2 597 228 T3

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175
 5 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190
 10 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205
 15 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 37
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una mutación L234A, L235A, y de botón
 <400> 37
 25 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15
 30 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30
 35 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45
 40 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 40 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80
 45 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95
 50 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110
 55 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125
 60 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 130 135 140
 65 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160
 65 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

ES 2 597 228 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190
 5
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205
 10
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 <210> 38
 <211> 222
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una mutación P329G
 20
 <400> 38
 25
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30
 30
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45
 35
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 40
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80
 45
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110
 50
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125
 55
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 130 135 140
 60
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160
 65
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

ES 2 597 228 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

5

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

10

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 39
 <211> 222
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una mutación L234A, L235A y P329G

20 <400> 39

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

25

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

35

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

40

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

45

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

50

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

55

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

60

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

65

ES 2 597 228 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

5 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

10 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 40
<211> 222

15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una mutación P239G y de hueco

20 <400> 40
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

25 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

30 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

35 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

40 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

45 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
115 120 125

50 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

55 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

60 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

65 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

ES 2 597 228 T3

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

5 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 41
<211> 222
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una mutación P329G, y de botón

15 <400> 41

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

20 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

25 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

30 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

35 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

40 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

45 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

50 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
130 135 140

55 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

60 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

65

ES 2 597 228 T3

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205
 5
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220
 10
 <210> 42
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una 234A, L235A, P329G, y de hueco
 <400> 42
 20 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15
 25 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30
 30 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45
 35 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 40 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80
 45 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95
 50 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110
 55 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
 115 120 125
 60 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 130 135 140
 65 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160
 60 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175
 65 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

ES 2 597 228 T3

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

5 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 43
<211> 222
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG1, humana con una mutación L234A, L235A, P329G y de hueco

15 <400> 43

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

20 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
25 35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

30 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

35 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
40 100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

45 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
130 135 140

50 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
55 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

60 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

65

ES 2 597 228 T3

<210> 44
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215 220

<210> 45
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 597 228 T3

<223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG4, humana, con una mutación S228P y L235E

<400> 45

5	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	1	5	10	15
10	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	20	25	30	
15	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	35	40	45	
20	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	50	55	60	
25	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	65	70	75	80
30	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	85	90	95	
35	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	100	105	110	
40	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	115	120	125	
45	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	130	135	140	
50	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	145	150	155	160
55	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	165	170	175	
60	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	180	185	190	
65	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	195	200	205	
	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	210	215	220			

<210> 46

<211> 222

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del isotipo de la región Fc de la IgG4, humana, con una mutación S228P, L235E y P329G

ES 2 597 228 T3

<400> 46

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

5

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

10

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

15

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

20

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

25

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

30

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

35

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

40

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

45

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

50

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

55

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 47

<211> 449

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio variable de una cadena pesada de Pertuzumab, combinado con una región constante de la subclase IgG1, humana, que contiene una mutación T366W

65

ES 2 597 228 T3

<400> 47

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1																	15
5																	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	
				20					25					30			
10																	
	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15																	
	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe	
		50					55					60					
20																	
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
25																	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30																	
	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
35																	
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
40																	
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
45																	
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
50																	
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
				165						170					175		
55																	
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
60																	
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200				205					
65																	
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
		210					215					220					
70																	
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	

ES 2 597 228 T3

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

5 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

10 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

15 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

20 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
355 360 365

25 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

30 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

35 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

40 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

45 <210> 48
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Dominio variable de una cadena ligera de Pertuzumab, combinado con un región constante de cadena ligera,
Kappa, humana

<400> 48

55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

60 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

65

ES 2 597 228 T3

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95

15 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

20 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

25 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

30 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

35 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

40 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

45 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

50 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 49
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> dominio variable de una cadena pesada de Trastuzumab, combinado con una región constante de cadena pesada, humana, de la subclase IgG1, que contiene una mutación T366S, L368A, y Y407V

<400> 49

55 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

60 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

65 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

ES 2 597 228 T3

5	Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val	50	55	60
10	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	65	70	75
15	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
20	Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	100	105	110
25	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	115	120	125
30	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala	130	135	140
35	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	145	150	155
40	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	165	170	175
45	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	180	185	190
50	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	195	200	205
55	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp	210	215	220
60	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	225	230	235
65	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	245	250	255
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	260	265	270

5

10 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

15 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

20 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

25 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

30 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350

35 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

40 Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

45 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

50 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

55 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

60 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

65 Gly Lys
450

<210> 50

55 <211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> dominio variable de una cadena ligera de Trastuzumab, combinado con una región constante de cadena ligera, kappa

<400> 50

65

ES 2 597 228 T3

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
	1				5					10					15		
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala	
				20					25					30			
	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
10	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
15		65				70					75					80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	
20					85					90					95		
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
				100					105					110			
25	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
			115					120					125				
	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
30		130					135					140					
	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
35		145				150					155					160	
	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				165						170					175		
40	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
			180						185					190			
	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
45			195					200					205				
	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
50		210															

<210> 51

<211> 241

<212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> fragmento Fab de anticuerpo, el cual comprende un dominio variable de cadena pesada, de Pertuzumab, y una región constante de cadena pesada, 1 (CH1), de la subclase IgG1 humana,, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal GGGSLPETGGSGSHHHHHH

<400> 51

65

ES 2 597 228 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	
				20					25					30			
10	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe	
15		50					55					60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
20																	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
25					85					90					95		
	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
30	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
35	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
40		145				150					155					160	
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
45					165					170					175		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
50	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
55	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Gly	Gly	
		210					215					220					
	Gly	Ser	Leu	Pro	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	His	His	His	His	His	
60		225				230					235					240	
	His																
	<210>	52															
	<211>	239															
65	<212>	PRT															

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> fragmento Fab de anticuerpo, el cual comprende un dominio variable de cadena pesada, de Pertuzumab, y una región constante de cadena pesada, 1 (CH1), de la subclase IgG1 humana,, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal GSLPETGGSGSHHHHHH

<400> 52

10	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1 5 10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr	20 25 30
15	Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35 40 45
20	Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe	50 55 60
25	Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	65 70 75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85 90 95
30	Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	100 105 110
35	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe	115 120 125
40	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu	130 135 140
45	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp	145 150 155 160
	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu	165 170 175
50	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	180 185 190
55	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro	195 200 205
60	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser	210 215 220
65	Leu Pro Glu Thr Gly Gly Ser Gly Ser His His His His His His	225 230 235

<210> 53
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> > fragmento Fab de anticuerpo, el cual comprende un dominio variable de cadena pesada, de Pertuzumab, y una región constante de cadena pesada, 1 (CH1), de la subclase IgG1 humana,, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal LPETGGSGSHHHHHH

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Leu Pro
 210 215 220

ES 2 597 228 T3

Glu Thr Gly Gly Ser Gly Ser His His His His His His
225 230 235

5 <210> 54
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223>> fragmento Fab de anticuerpo, el cual comprende un dominio variable de cadena pesada, de Trastuzumab, y una región constante de cadena pesada, 1 (CH1), de la subclase IgG1 humana,, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal GGGSLPETGGSGSHHHHHH

15 <400> 54

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

65

ES 2 597 228 T3

5 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

10 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly
210 215 220

15 Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Ser Gly Ser His His His His
225 230 235 240

His His

20 <210> 55
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> fragmento Fab de anticuerpo, el cual comprende un dominio variable de cadena pesada, de Trastuzumab, y una región constante de cadena pesada, 1 (CH1), de la subclase IgG1 humana,, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal GSLPETGGSGSHHHHHH

30 <400> 55

35 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

45 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

50 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

60 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

65 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

70 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

ES 2 597 228 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

5

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

10

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

15

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

20

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

25

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly
 210 215 220

30

Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Ser Gly Ser His His His His His His
 225 230 235 240

<210> 56
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> fragmento Fab de anticuerpo, el cual comprende un dominio variable de cadena pesada, de Trastuzumab, y una región constante de cadena pesada, 1 (CH1), de la subclase IgG1 humana,, que contiene una secuencia de aminoácidos C-terminal LPETGGSGSHHHHHH

40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

45

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

50

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

55

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

65

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 597 228 T3

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 5
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 10
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 15
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 20
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 25
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 30
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Leu
 210 215 220
 35
 Pro Glu Thr Gly Gly Ser Gly Ser His His His His His His
 225 230 235
 <210> 57
 <211> 230
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)) con una mutación T366S, L368A y
 45 Y407V, el cual contiene una secuencia N-terminal gggdkthtppc
 <400> 57
 50
 Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 1 5 10 15
 55
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 20 25 30
 60
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 35 40 45
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

ES 2 597 228 T3

	50	55	60
5	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn 65 70 75 80		
10	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp 85 90 95		
15	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro 100 105 110		
20	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu 115 120 125		
25	Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn 130 135 140		
30	Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 145 150 155 160		
35	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 165 170 175		
40	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys 180 185 190		
45	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 195 200 205		
50	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 210 215 220		
55	Ser Leu Ser Pro Gly Lys 225 230		

<211> 226

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)) con una mutación con una mutación T366S, L368A e Y407V, el cual contiene la secuencia N-terminal gghtcppc

55 <400> 58

60

ES 2 597 228 T3

[illegible]

ES 2 597 228 T3

5
 Gly Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 1 5 10 15

10
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 20 25 30

15
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 35 40 45

20
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 50 55 60

25
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 65 70 75 80

30
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 85 90 95

35
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 100 105 110

40
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 115 120 125

45
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 130 135 140

50
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 145 150 155 160

55
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 165 170 175

60
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 180 185 190

65
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 195 200 205

60
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 60

<211> 230

<212> PRT

65 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)) con una mutación T366W mutación, el cual contiene la secuencia N-terminal ggdkthtccpc

5

<400> 60

10	Gly	Gly	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	1	5	10	15
15	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	20	25	30	
20	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	35	40	45	
25	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	50	55	60	
30	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	65	70	75	
35	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	85	90	95	
40	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	100	105	110	
45	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	115	120	125	
50	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	130	135	140	
55	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	145	150	155	
60	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	165	170	175	
65	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	180	185	190	
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	195	200	205	
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	210	215	220	
							Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					225	230		

<210> 61

<211> 226

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)) con una mutación T366W, el cual contiene la secuencia N-terminal gghtcpcp

10

<400> 61

Gly Gly His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
1 5 10 15

15

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
20 25 30

20

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
35 40 45

25

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
50 55 60

30

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
65 70 75 80

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
85 90 95

35

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
100 105 110

40

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
115 120 125

45

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
130 135 140

50

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
145 150 155 160

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
165 170 175

55

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
180 185 190

ES 2 597 228 T3

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 195 200 205

5

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 210 215 220

10

Gly Lys
 225

15

<210> 62
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Polipéptido de la región Fc, de cadena pesada (IgG1 humana (CH2-CH3)) con una mutación T366W, el cual contiene la secencia N-terminal ggcppc

<400> 62

25

Gly Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 1 5 10 15

30

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 20 25 30

35

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 35 40 45

40

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 50 55 60

45

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 65 70 75 80

50

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 85 90 95

55

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 100 105 110

60

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 115 120 125

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 145 150 155 160

ES 2 597 228 T3

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 165 170 175

5

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 180 185 190

10

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 195 200 205

15

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Fragmento Fab del extremo C-terminal

25 <400> 63

Leu Pro Glu Thr Gly Gly Ser Gly Ser His His His His His His
 1 5 10 15

30

<210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Fragmento Fab del extremo C-terminal 2

<400> 64

40

Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Ser Gly Ser His His His His His
 1 5 10 15

His

45

<210> 65
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Fragmento Fab del extremo C-terminal 3

<400> 65

55

Gly Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Ser Gly Ser His His His
 1 5 10 15

His His His

60

<210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sortasa tag 7

5 <400> 66

Gly Gly His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5

10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sortasa tag 8

20 <400> 67

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10

25

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para producir un anticuerpo biespecífico, el cual comprende la etapa de incubar

5 (i) un fragmento de anticuerpo Fab, o un anticuerpo scFv, el cual comprende, en el ámbito de los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02), en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con $n = 1, 2 \text{ ó } 3$,

10 (ii) un fragmento de anticuerpo de una sola ramificación, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo,

15 en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, las cuales son complementarias, la una con respecto a la otra, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno

20 en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y

25 en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos GGCPX4C (SEQ ID NO: 08), en donde, X4, es S ó P, en su extremo N-terminal,

y

25 (iii) una enzima Sortasa A,

y, mediante ello, producir el anticuerpo biespecífico.

30 2.- Un procedimiento para producir un anticuerpo biespecífico, el cual comprende las siguientes etapas

(i) determinar los marcadores de superficie, celulares, presentes en una muestra que contiene células, y seleccionar, de entre éstos, por lo menos un marcador de superficie celular,

35 (ii) incubar (a) un fragmento de anticuerpo Fab, ó un anticuerpo scFv, el cual comprende, en los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con $n = 1, 2 \text{ ó } 3$, en donde, el fragmento Fab o el anticuerpo scFv, se une, de una forma específica, al primer marcador de superficie celular o su ligando, (b) un fragmento de anticuerpo, de una sola ramificación, el cual comprende una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, complementarias, la una con la otra, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno, el cual se une, de una forma específica, al segundo marcador específico de superficie celular, o su ligando, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos GGCPX4C (SEQ ID NO: 08), en donde, X4, es S ó P, en su extremo N-terminal, y (c) una enzima Sortasa A,

50 y, mediante ello, producir un anticuerpo biespecífico.

3.- Un procedimiento para determinar una combinación de sitios de unión al antígeno, el cual comprende las siguientes etapas

55 (i) determinar la especificidad y / o selectividad y / o afinidad y / o función efectora, de unión, y / o vida media in vivo, de una multitud de anticuerpos biespecíficos, preparados mediante la combinación de (a) cada uno de los miembros de una primera multitud de fragmentos de anticuerpo Fab, o fragmentos de anticuerpo scFv, en donde, cada miembro, comprende, en los residuos de los 20 aminoácidos C-terminales, la secuencia de aminoácidos GnSLPX1TG (SEQ ID NO: 02, en donde, X1, puede ser cualquier residuo de aminoácidos, con $n = 1, 2 \text{ ó } 3$, en donde, el fragmento Fab o el anticuerpo scFv, se une, de una forma específica, al primer epítipo o antígeno, con (b) cada miembro de una multitud de fragmentos de anticuerpo, de una sola ramificación, comprendiendo una cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, una cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, y un polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y la cadena ligera de anticuerpo, de longitud total, son cadenas de anticuerpo, cognadas, complementarias, la una con la otra, y el par de dominios variables (VH y VL) de éstas, forman un sitio de unión al antígeno, el cual se une, de una

forma específica, al segundo epítipo o antígeno, en donde, la cadena pesada de anticuerpo, de longitud total, y el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, se encuentran enlazados, de una forma covalente, el uno con el otro, vía uno o más enlaces de disulfuro, formando una región bisagra de anticuerpo, y en donde, el polipéptido de la región Fc, de cadena pesada, de anticuerpo, tiene una secuencia de aminoácidos GGCPX4C (SEQ ID NO: 08), en donde, X4, es S ó P, en su extremo N-terminal, y (c) una enzima Sortasa A,

y

(ii) elegir el anticuerpo biespecífico, con una apropiada especificidad y / o selectividad y / o afinidad y / o función efectora, de unión, y / o vida media, in vivo, y determinando, con ello, una combinación de sitios de unión al antígeno.

4.- El procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de que, la región Fc de anticuerpo humano, comprende una mutación del residuo de aminoácidos, de origen natural, en la posición 329, y por lo menos una mutación adicional, de por lo menos un residuo de aminoácidos, seleccionado de entre el grupo el cual comprende los residuos de aminoácidos, en la posición 228, 233, 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, y 331, a un residuo diferente, en donde, los residuos, en la región Fc de anticuerpo, se enumeran, en concordancia con el índice de Kabat, de la Unión Europea (EU index de Kabat), en donde, la mutación del residuo de aminoácidos de origen natural, es S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, P329G, y / o P331S.